

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid



Descripción de la Transfagocitosis, una vía para la captura de bacterias y la presentación antigénica por parte de los linfocitos T CD4⁺: posibles aplicaciones en biomedicina.

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica y Biología

Guillermo Ramirez Santiago

Para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Tesis dirigida por

Doctor Esteban Véiga Chacón

y

Doctora Aránzazu Cruz-Adalia

El trabajo de tesis ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología y Hospital Universitario Santa Cristina, en colaboración con el departamento de Inmunología del Hospital de La Princesa y el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

***Luchar, buscar,
encontrar y no rendirse***

Ulises

Alfred Tennyson

*A mi familia y amigos,
a todos los que me han ayudado,
a Olga*

Agradecimientos

Agradecimientos

El fin de una etapa.

Aún recuerdo a un joven Guillermo, recién salido de la licenciatura, cual niño con zapatos nuevos en busca de un futuro trabajo en investigación, siempre y cuando fuera posible, porque claro, las condiciones no eran las idóneas (ni siquiera sé si ese concepto existe aún a día de hoy). Con ilusión y energía emprendí una búsqueda que me llevó hasta Esteban Veiga, un joven investigador recientemente llegado de Francia. Recuerdo con cariño la entrevista en nuestro querido Hospital de la Princesa, en ese departamento de inmunología que por aquel entonces regentaba, “qué buena gente es” fue mi primera impresión. A día de hoy lo sigo pensando, y gracias a eso y la buena gente que le rodea he logrado llegar hasta aquí, porque toda tesis no se compone tan solo del trabajo de una persona, sino del esfuerzo conjunto de muchas, aunque el escrito lo haga uno y lo corrijan unos pocos.

Mi querido laboratorio, cuanto lo echaré de menos. Arantxa hablando sola en el despacho, Mónica con su Kiss Fm dándolo todo, Esteban y su carácter afable siempre con algo que contar y charlar, mis queridos polluelos Raquel y Jesús con su sonrisa perpetua que alegra el día a cualquiera... Os agradezco infinitamente todo el apoyo, los consejos y la paciencia que habéis tenido conmigo. Las horas y horas de experimentos de gentamicina juntos, los paseos a los animalarios de todo Madrid, los congresos, los cafés al sol, las tardes de oscuro y frío confocal... por todo, mil gracias amigos.

Quiero hacer una especial mención a mis padres, mi hermana y Olga, habéis sido mi otro gran pilar sobre el que he cimentado mi tesis, mi apoyo en los momentos de flaqueza. Papá, mamá, sé que a veces ha sido difícil, pero creo que lo habéis hecho lo mejor posible, lo cual significa que habéis dado lo mejor de vosotros, que es lo máximo que puede hacer una persona. No puedo decir gracias porque la expresión se queda tremendamente corta, por eso os digo que sois un ejemplo para mí, ojalá sea algún día tan buen padre como lo habéis sido y sois vosotros. Olga, preciosa, sin ti no hubiera encontrado el sentido a nada, eres mi compañera en este viaje en aguas turbulentas. Gracias por ser mi consejera, mi conciencia y mi amiga, por tu sinceridad y sabiduría, sin ti no sería lo que soy.

Gracias a toda mi familia, mis tíos Sagrario y Jose (mis segundos padres), mis tios Ana y Joaquín, y todos los demás, gracias, aunque creáis que no habéis participado, aunque ni siquiera sepáis de qué diantres trata esta tesis doctoral, sois parte de ella pues sois parte de mí.

En mi tesis han influido multitud de personas, amigos, colaboradores y otros. En especial quiero agradecer al doctor Francisco Sánchez-Madrid su apoyo al proyecto/s, su ayuda nos ha sacado de momentos oscuros, y nos ha brindado oportunidades valiosas. Le agradezco su ayuda, pero también su labor como investigador senior, la cual no se limita a publicar y ser citado, sino a ayudar a los que empiezan, ayudar a nuestra maltratada ciencia que tanto necesita a personas de esta altura moral. Gracias a las buenas gentes del Hospital de la Princesa, Rocío, Alba, David, Javi, Álvaro, Pablo, Rafa, Lidia, Eugenio, MJ, Noelia y compañía, por esos ratos de cafés extrovertidos, de cervezas pos laboratorio y de risas desenfadadas. Gracias también a mi querida gente del Hospital Universitario Santa Cristina, a María Yáñez Mo y su equipo de MYMOsas, Henar y Soraya, os echo y echaré mucho de menos siempre, a Julián Aragonés y su equipo, Daniel, Óscar, Flori, Inés, Mar, Ángel, Bárbara y Ainara. A los compañeros del CNIC, que tanto nos han aguantado en las largas colaboraciones, Gloria, María Laura, Daniel, Marta, Fran, Giulia y Cristina, gracias por vuestra ayuda, paciencia y comprensión.

La vida profesional está bien, pero en lo personal quiero agradecer a todos mis amigos del alma, de toda la vida el estar ahí, a mi lado, durante todo este tiempo, ante viento y marea, llueva nieve o truene, siempre ahí... que cansinos que sois y cuanto os quiero jajaja No espero que entendáis la tesis pero se bien que entendéis lo que me ha costado sacarla adelante. Espero teneros siempre a mi lado para reírnos de la nieve, el agua y los truenos, que nos lleve la tempestad, que nos tire el viento y nos riamos, nos levantemos, curemos las heridas y sigamos. Pues en el fondo nacimos para esto, luchar y nunca rendirnos.

Daría las gracias a los ratones que han dado su vida por este proyecto, espero que vuestras vidas hayan servido para algo.

Agradecimientos

Finalmente gracias a ti, Guillermo de 24 años, porque tuviste el coraje y la valentía de emprender esta aventura, aún sabiendo que no sería fácil. Creo que no nos ha salido mal, pero el tiempo dirá el resto.

Índices

Índice de apartados

Abreviaturas	24
Resumen/Summary	27
1. Introducción	33
1.1 Visión clásica del Sistema Inmune	34
1.1.2 Receptores para el reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRRs)	36
1.3 La Sinapsis Inmune	37
1.3.1 Sinapsis inmune en linfocitos T	38
1.4 Sistema inmune adaptativo	40
1.4.1 Respuesta inmune mediada por linfocitos T	41
1.4.1.1 Linfocitos T CD4 ⁺	41
1.4.1.2 Linfocitos T CD8 ⁺	44
1.4.1.3 Subpoblaciones “singulares”	49
2. Objetivos	53
3. Materiales y Métodos	57
3.1 Materiales	58
3.1.1 Ratones	58
3.1.2 Anticuerpos	59
3.1.3 Cepas Bacterianas	59
3.1.4 Otros Materiales	60
3.2 Métodos	61
3.2.1 Selección negativa de linfocitos de ratón	61
3.2.2 Aislamiento y diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón	61
3.2.3 Aislamiento de células primarias derivadas de sangre periférica de origen humano	62
3.2.4 Transfagocitosis	63

Índice de apartados

3.2.5 Ensayo de supervivencia a gentamicina	64
3.2.6 Preparación de muestras primarias para criomicroscopia de rayos X	65
3.2.7 Ensayo de citotoxicidad específica	66
3.2.8 Purificación de linfocitos T CD4 ⁺ por “ <i>sorting</i> ”	66
3.2.9 Inmunofluorescencia de muestras primarias	67
3.2.10 Vídeo microscopia de células vivas	68
3.2.11 Análisis de la producción de citoquinas de linfocitos CD4 ⁺ tf	68
3.2.12 Agregación celular usando anti-CD43	69
3.2.13 Protección <i>in vivo</i> de linfocitos T CD4 ⁺ tf frente a infecciones primarias de <i>Listeria</i>	69
3.2.14 Ensayos <i>in vitro</i> de proliferación de linfocitos T CD8 ⁺	69
3.2.15 Ensayos <i>in vivo</i> de proliferación de linfocitos T CD8 ⁺	70
3.2.16 Análisis de linfocitos CD8 ⁺ T memoria durante la infección de <i>Listeria monocytogenes in vivo</i>	71
3.2.17 Prueba de concepto de linfocitos T CD4 ⁺ tf como agentes anti tumorales (melanoma B16-OVA)	72
3.2.18 Western-Blotting	72
3.2.19 Análisis estadístico	72
4. Resultados	75
4.1 Los linfocitos T CD4 ⁺ convencionales no fagocitan bacterias directamente	76
4.2 Las bacterias fagocitadas por BMDC se polarizan a las sinapsis inmunes	78
4.3 Los linfocitos T CD4 ⁺ convencionales capturan bacterias desde DC infectadas	81
4.4 La transfagocitosis es específica para bacterias	88
4.5 La transfagocitosis por parte de los linfocitos es dependiente de la actividad del citoesqueleto	89

Índice de apartados

4.6 Las bacterias transfangocitadas por los linfocitos T CD4 ⁺ provienen tanto del interior de las DC como de la superficie de las mismas	91
4.7 La patogenicidad de las bacterias no influye sobre la transfangocitosis	92
4.8 Los linfocitos T transfangocíticos son capaces de degradar las bacterias que capturan	94
4.9 Los linfocitos T CD4 ⁺ transfangocíticos son pro-inflamatorios	95
4.10 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf confieren protección frente a <i>Listeria in vivo</i>	97
4.11 Las células T CD4 ⁺ tf establecen sinapsis inmunes con células T CD8 ⁺ vírgenes	99
4.12 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf realizan presentación cruzada a los linfocitos T CD8 ⁺ <i>in vitro</i>	100
4.13 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf procesan los antígenos bacterianos endógenamente	105
4.14 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf activan a los linfocitos CD8 ⁺ hasta el estadio CTL	111
4.15 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf son capaces de realizar presentación cruzada a células CD8 ⁺ <i>in vivo</i>	112
4.16 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf tienen un papel clave en la generación de linfocitos T CD8 ⁺ memoria	113
4.17 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf tienen potenciales usos en inmunoterapia contra el cáncer	118
Discusión	121
Conclusiones	133
Bibliografía	139
Anexos	160
Anexo1: pie de figura vídeos	161
Anexo2: publicaciones	163

Índice de figuras

Figura 1.1 Órganos linfoides secundarios (SLOs)	36
Figura 1.2 La Sinapsis Inmune (SI)	39
Figura 1.3 Diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺	42
Figura 1.4 Visión clásica de la respuesta de linfocitos T CD8 ⁺	46
Figura 4.1 Infección directa en linfocitos	77
Figura 4.2 Polarización de las bacterias hacia la IS	79
Figura 4.3 Los linfocitos capturan bacterias desde DC infectadas	82
Figura 4.4 Cuantificación de la captura bacteriana por linfocitos T CD4 ⁺ de ratón	84
Figura 4.5 Cuantificación de la captura bacteriana por linfoblastos humanos	86
Figura 4.6 La transfagocitosis es específica	88
Figura 4.7 El citoesqueleto de los linfocitos T juega un papel central en la transfagocitosis	90
Figura 4.8 Bacterias no patógenas también pueden ser transfagocitadas	91
Figura 4.9 Los linfocitos transfagocíticos destruyen las bacterias que capturan	93
Figura 4.10 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf son pro-inflamatorios	95
Figura 4.11 Los linfocitos transfagocíticos confieren protección contra infecciones <i>in vivo</i>	96
Figura 4.12 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf presentan antígenos de las bacterias que capturan	98
Figura 4.13 Los linfocitos CD4 ⁺ tf presentan antígenos de las bacterias que degradan, activando células T CD8 ⁺ (presentación cruzada)	101
Figura 4.14 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf son extraordinarios presentadores antigénicos	103
Figura 4.15 Los linfocitos T CD4 ⁺ tf procesan (y presentan) los antígenos bacterianos de forma endógena	106
Figura 4.16 El procesamiento de los antígenos bacterianos por parte de los linfocitos CD4 ⁺ tf requiere de TAP1 (procesamiento canónico)	108
Figura 4.17 La activación mediada por T CD4 ⁺ tf produce linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos.	109

Figura 4.18 Presentación cruzada de linfocitos T CD4 ⁺ tf <i>in vivo</i>	110
Figura 4.19 Esquema de experimento para analizar el papel de los linfocitos T CD4 ⁺ tf en la generación de linfocitos T CD8 ⁺ de memoria	113
Figura 4.20 Análisis fenotípico de linfocitos T CD8 ⁺ memoria generados por linfocitos T CD4 ⁺ tf <i>in vivo</i>	114
Figura 4.21 Prueba de concepto de los linfocitos T CD4 ⁺ tf como nueva generación de inmunoterapias contra el cáncer	117
Figura 5.1 Modelo de activación de linfocitos T CD8 ⁺ mediante linfocitos T CD4 ⁺ tranfagocíticos	127

Abreviaturas

APC	Célula presentadora de antígeno
BHI	Infusión de cerebro y corazón
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CD	Cluster de diferenciación
cDC	Células dendríticas convencionales
CG	Centro germinal
cSMAC	Cluster de activación supramolecular central
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Células Dendríticas
dSMAC	Cluster de activación supramolecular distal
FBS	Suero fetal Bovino
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HCV	Virus de la hepatitis C
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
KO	Truncado
LB	Luria Bertani
LN	Nódulos linfáticos
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2
MOI	Multiplicidad de infección
NKs	Linfocitos NK o asesinos naturales
OVA	Ovoalbúmina
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
pDC	Células dendríticas plasmacitoides
PFA	Paraformaldehído
PRR	Receptores para el reconocimiento de patrones
pSMAC	Cluster de activación supramolecular periférico
RLR	Receptores RIG-1-like
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SEE	Super Antígeno E
SLO	Órganos linfoides secundarios
SMAC	Cluster de activación supramolecular
SN	Sobrenadante
TCM	Linfocitos T CD8 ⁺ memoria central
TCR	Receptor de células T
TEFF	Linfocitos T CD8 ⁺ efectores
TEM	Linfocitos T CD8 ⁺ memoria efectora
tf	Transfagocítico
TGF	Factor de crecimiento transformante

TLR	Receptores Toll-like o tipo toll
TNF	Factor necrótico de tumores
UFC	Unidades formadoras de colonias
WT	Salvaje o silvestre

Resumen/Summary

Resumen

En esta tesis presentamos datos que muestran cómo los linfocitos T CD4⁺, paradigma de la inmunidad adaptativa, son capaces de capturar y destruir bacterias desde células dendríticas (DCs) infectadas por un proceso que hemos denominado “transfagocitosis”. Los linfocitos transfagocíticos (tf) secretan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias que dan lugar a una respuesta del tipo Th-1, una reminiscencia de la inmunidad innata. Sorprendentemente, los linfocitos T CD4⁺tf procesan los antígenos bacterianos y los presentan a linfocitos T CD8⁺ vírgenes por presentación cruzada, algo esencial para la activación de la respuesta T CD8⁺ y por lo tanto crucial para la respuesta inmune frente a infecciones o cáncer. Nótese que estas funciones hasta ahora eran atribuidas principalmente a células fagocíticas profesionales, esencialmente DC.

Analizamos el comportamiento de los linfocitos TCD4⁺tf como células presentadoras de antígenos (presentación cruzada) *in vitro* e *in vivo* usando *Listeria*-OVA (cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina) como modelo de infección bacteriana. Mostramos cómo la mayor parte de la activación de los linfocitos T CD8⁺ es debida al procesamiento de los péptidos bacterianos por los T CD4⁺tf. Además, mostramos que el procesamiento de los péptidos bacterianos en los T CD4⁺tf depende, al menos en parte, de TAP1 (proteína clave en la carga de los péptidos en el MHC-I), lo que indica que los linfocitos T CD4⁺ procesan de forma canónica los antígenos de las bacterias que capturan.

Para confirmar la relevancia fisiológica de este proceso de presentación antigénica mediada por linfocitos realizamos experimentos *in vivo* activando el repertorio endógeno de linfocitos T CD8⁺ durante infecciones bacterianas (*Listeria monocytogenes*). Estos datos muestran que la presentación cruzada que realizan los linfocitos T CD4⁺tf induce la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria central (CD44⁺CD62L^{high}CCR7⁺), los cuales expresan bajos niveles de PD-1. Es bien conocido que los linfocitos T CD4⁺ son necesarios para la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria central, aunque hasta ahora se les atribuía un rol limitado a la activación de DC. Nuestros datos expanden el conocimiento de las funciones de los linfocitos T CD4⁺ en la respuestas de memoria. La capacidad de generación de linfocitos

T CD8⁺ de memoria con bajos niveles de PD-1, junto con la secreción de altas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los T CD4⁺tf, podría explicar el extraordinario resultado de nuestro experimento de prueba de concepto frente a tumores. Este experimento muestra cómo la presentación antigénica mediada por los linfocitos T CD4⁺tf desencadena una respuesta T CD8⁺ frente a un melanoma agresivo (B-16 OVA) que impide el crecimiento tumoral. Estos datos muestran a los linfocitos T CD4⁺tf como una novedosa herramienta con gran potencial para la inmunoterapia contra el cáncer.

Summary

We present data showing that conventional CD4⁺ T cells, the paradigm of adaptive immunity, are able to capture (and kill) bacteria from infected dendritic cells (DC) by a process termed transphagocytosis. Transphagocytic (tp) CD4⁺ T cells secrete large amounts of pro-inflammatory cytokines providing a rapid Th1-like response, reminiscent of the innate immune responses. Strikingly, tpCD4⁺ T cells process bacterial antigens and prime naïve CD8⁺ T cells by cross-presentation, essential for CD8⁺ T cell activation and thus crucial for immune responses to cancer or infectious diseases. Note that cross-presentation is currently thought to be a function only of professional phagocytes, mainly DC.

We analyzed the activity of tpCD4⁺ T cells as antigen cross-presenting cells *in vitro* and *in vivo* using first *Listeria*-OVA (*Listeria monocytogenes* expressing ovalbumin) as bacterial model, and show that the vast majority of the CD8⁺ T cell activation is due to antigen processing inside tpCD4⁺ T cells. In addition, we show that antigen processing by tpCD4⁺ is mediated by Tap1 (a key protein involved in MHC-I/antigen coupling), demonstrating that CD4⁺ T cells require the canonical antigen presentation machinery in order to activate CD8⁺ T cells.

Additionally, we performed *in vivo* assays that confirmed the relevance of tpCD4⁺ T cells-mediated antigen presentation, activating the endogenous repertoire of CD8⁺ T cells during the course of a bacterial infection (*Listeria monocytogenes*). These data show that the antigen presentation mediated by tpCD4⁺ T cells induces central memory CD8⁺ T cells (CD44⁺CD62L^{high}CCR7⁺), which interestingly express low levels of PD-1. It is well known that CD4⁺ T cells are necessary for the generation of memory CD8⁺ T cell response, but the role of CD4⁺ T cells in the generation of memory CD8⁺ T cells is thought to be limited to DCs activation. Now, our results expand the knowledge of roles played by CD4⁺ T cell during memory response. The ability to generate memory CD8⁺ T cells expressing low levels of PD-1, together with the pro-inflammatory nature of tpCD4⁺ T cells could explain the extraordinary results observed in a proof of concept experiment showing tpCD4⁺ T cells trigger CD8⁺ T cell response against an aggressive mouse melanoma (B-16 OVA), impeding tumor growth. These data underscore the role of tpCD4⁺ T cells as novel

and potentially useful tools in cancer immunotherapies.

Introducción

1.1 Visión clásica del Sistema Inmune

El sistema inmune de los vertebrados se ha dividido en dos tipos de inmunidad atendiendo a diferencias funcionales: innata y adaptativa. La inmunidad innata, proporciona una respuesta rápida, y menos específica que la inmunidad adaptativa frente a agentes externos. Algunos tipos celulares típicos de la inmunidad innata son, macrófagos, células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*), monocitos, neutrófilos y linfocitos NK (*Natural Killer lymphocytes*) (Abbas et al., 2015).

Un papel clave de la inmunidad innata es la activación del sistema inmune adaptativo. Este papel lo realizan las llamadas células presentadoras de antígenos ("Antigen Presenting Cells" o APC), y como su nombre indica se encargan de la presentación antigénica a linfocitos. De todas las APC, las más efectivas son las DC, responsables en gran medida de generar la presentación antigénica a linfocitos T y B, y por lo tanto las principales responsables de la activación del sistema inmune adaptativo (Joffre et al., 2012). Las DC fueron descubiertas en los años 70 como un tipo celular residente en los órganos linfáticos (Steinman et al., 1974). Hoy en día se sabe que residen en varios tejidos y se clasifican en diferentes subtipos. La activación de las DC se produce como respuesta a una infección o daño tisular, dado que dichas situaciones exponen moléculas capaces de activar unos receptores de las DC llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptors*). En un contexto de infección, las DC son particularmente eficientes en la captura de patógenos y en el procesamiento y presentación de sus antígenos, los cuales son transportados hasta los órganos linfáticos secundarios (*Secondary lymphoid organs*, SLO) más cercanos (Alloatti, 2016). Allí se sitúan en las zonas ricas en linfocitos T, a los cuales les presentan los antígenos que procesan (Banchereau, 1998). Los SLO tienen una compleja y organizada micro-arquitectura, la cual compartimenta las interacciones celulares, potenciando los encuentros entre los antígenos (presentados por APC) y los linfocitos (Karrer U. et al., 1997). Esta estructura de los SLO provee de un microambiente idóneo para la generación de la respuesta inmune y la determinación del destino celular de los linfocitos activados por la presentación antigénica (Figura 1.1).

Las DC se activan durante el proceso de captación de los patógenos/antígenos, produciéndose cambios profundos en las DC, entre ellos un aumento en la expresión de los complejo mayores de histocompatibilidad 1 y 2 (MHC, *Major Histocompatibility Complex I y II*), de genes relacionados con la maquinaria

de procesamiento de antígenos, de moléculas co-estimuladoras (como CD80 y CD86) y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (como IL-6, IFN- γ y TNF- α) (Sousa, 2006). Todos estos cambios tienen como fin promover la presentación antigénica y activar la inmunidad adaptativa. Una vez captado el patógeno en una vesícula, ésta se fusiona con lisosomas de pH ácido (vía lisosomal), lo cual produce la destrucción del patógeno y el procesamiento de sus componentes, incluidas las proteínas que se desnaturalizan y cortan en péptidos (serán los antígenos) (Bird et al., 2009). Para la presentación antigénica, los antígenos peptídicos se cargan en los complejos MHC I y II. El MHC-II se encuentra en vesículas citosólicas en su forma inactiva (unido a péptido CLIP), se carga con péptidos exógenos al fusionarse la vesícula que lo contiene con un lisosoma. El MHC-I se encuentra en el retículo endoplásmico, donde encuentra péptidos endógenos (en algunos casos exógenos, ver más bajo) (Lázaro et al., 2015). Prácticamente todos los tipos celulares del organismo expresan MHC-I pero sólo las APC expresan MHC-II. Los MHC cargados con péptidos son reconocidos por receptores de células T (TCR, *T Cell Receptor*) (Kronenberg et al. 1986). El MHC-II presenta péptidos exógenos a los linfocitos T CD4⁺ mientras que MHC-I presenta péptidos endógenos a los linfocitos T CD8⁺. Existe un tercer tipo de presentación, la cual se ha denominado “presentación cruzada” que consiste en la presentación de péptidos exógenos vía MHC-I. Para que se presenten péptidos exógenos vía MHC-I, han de translocarse péptidos procedentes de degradación lisosomal al citoplasma y de allí al retículo endoplásmico, mediante transportadores peptídicos (*Transporter associated with antigen processing*, TAP), para allí cargarse en el MHC-I. Este tipo de presentación juega un papel fundamental en la respuesta inmune contra patógenos y en la respuesta antitumoral, además se cree que mayoritariamente es llevada a cabo *in vivo* por DC (Alloatti, 2016). Las DC tienen una menor capacidad degradativa que los macrófagos o los neutrófilos (Delamarre, 2005a), pero se consideran las mejores células presentadoras de antígenos (Alloatti, 2016). En la actualidad, algunas subpoblaciones de DC (DC CD8⁺ y CD103⁺) han sido descritas como poblaciones especializadas en la presentación cruzada de antígenos (Bedoui et al., 2009; Haan et al., 2000). En cambio, la población DC CD11b⁺ ha sido descrita como particularmente efectiva en la presentación por MHC-II (Dudziak et al., 2007; McLachlan et al., 2009).

Figura 1.1

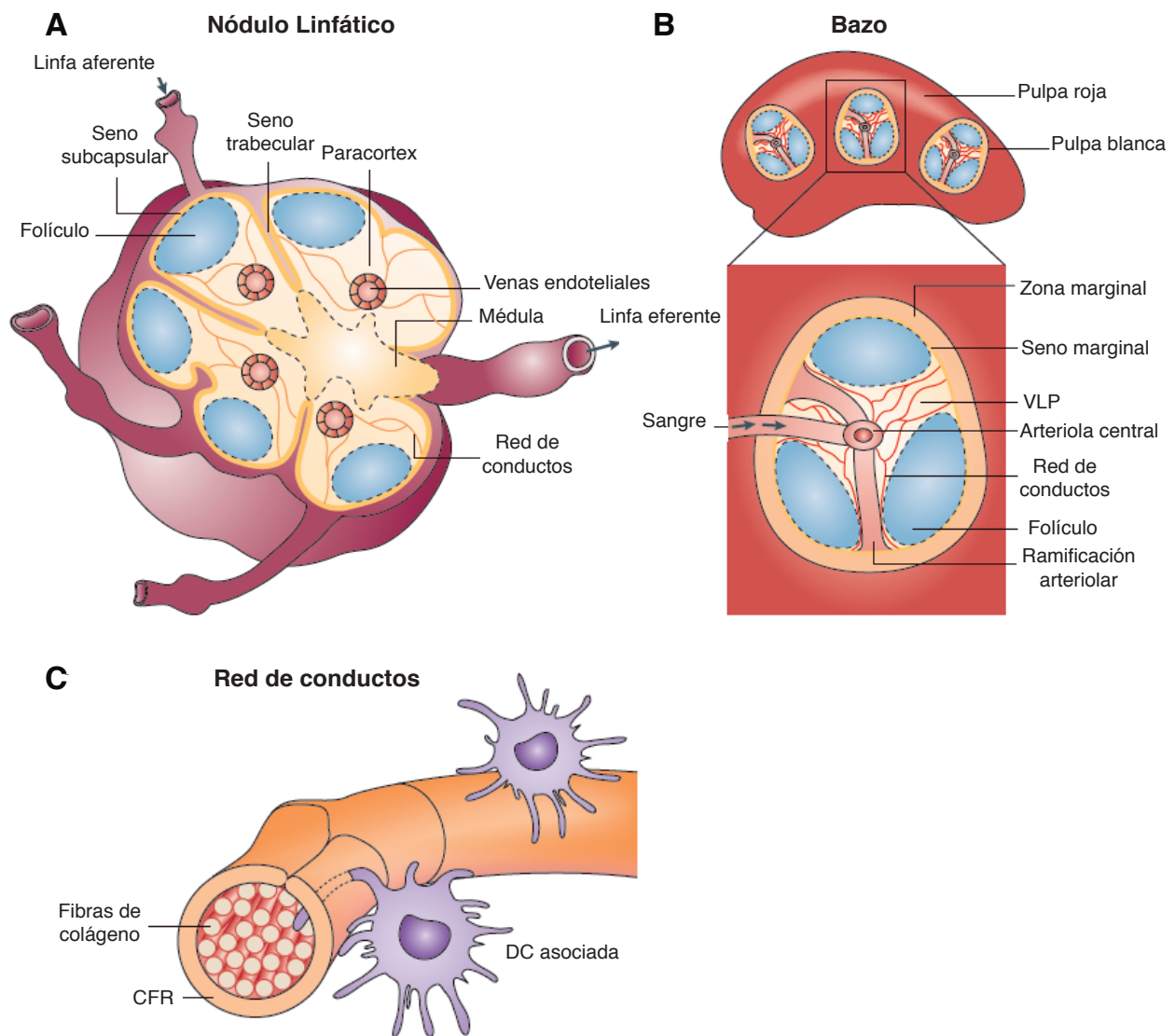


Figura 1.1 Órganos linfoides secundarios (SLO): en esta figura se muestran en detalle **(A)** un nódulo linfático (LN), **(B)** un bazo y **(C)** un detalle de la red de conductos que surcan los SLO. **(A)** El nódulo linfático se subdivide en tres regiones diferentes: médula, paracortex (también denominados zona de linfocitos T) y folículos (también conocidos como zona de linfocitos B). La linfa (cargada de posibles antígenos) fluye desde los vasos aferentes hasta el seno subcapsular, y desde éste al seno trabecular, finalmente fluye a la médula y sale a los vasos linfáticos. En su paso por el paracortex, la linfa, fluye por la red de conductos **(C)**, donde se permite el paso de componentes de bajo peso molecular como citoquinas y antígenos de bajo peso molecular. Las venas endoteliales permiten el paso de linfocitos desde la sangre hasta el LN. En el bazo, la pulpa blanca consiste en el paracortex, folículos (donde residen los linfocitos B), una arteriola central, y una zona marginal. La sangre llega al bazo por el seno marginal a través de ramificaciones de la arteriola central, y desde allí puede fluir hasta la pulpa roja a través de la zona marginal, o bien hasta la pulpa blanca por medio de la red de conductos. **(C)** La red de conductos en los LN se compone de un núcleo de colágeno recubierto de células fibroblásticas reticulares (CFR). Los conductos suelen tener DCs asociadas a las CFR, las cuales suelen extender protrusiones hasta el interior del conducto para tomar contacto con la linfa que transporta. Imagen orginical tomada de *Facundo D. Batista and Naomi E. Harwood 2009*.

1.1.2 Receptores para el reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*, PRR)

Los PRR son receptores que reconocen moléculas conocidas como patrones asociados a patógenos (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*), y también moléculas endógenas reconocidas como señales de peligro (DAMP, *damage-associated molecular patterns*). Los PRR pueden estar asociados a la membrana como los de la familia de los tipos toll ("*Toll-like receptors*", TLR), o los receptores de lectinas tipo C, o bien ser intracelulares como los receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*). Los PRR son extremadamente importantes en la inmunidad innata, ya que son los encargados de detectar los patógenos, activar la respuesta rápida de del sistema inmune innato y disparar los procesos de inflamación, fagocitosis y activación del sistema inmune adaptativo (Cao, 2016).

Se han identificado una gran cantidad de PRR en los últimos años, sensibles a una gran cantidad de moléculas asociadas a daño celular, productos virales, fúngicos y bacterianos. Algunos TLR reconocen peptidoglicanos y lipopéptidos bacterianos (TLR 1, 2 y 6), otros lipopolisacárido (LPS) (TLR 4), flagelina (TLR 5), ácidos nucleicos de doble cadena como el RNA viral (TLR 3), ácidos nucleicos de cadena simple, RNA (TLR 7, 8) o bien DNA no metilado (TLR 9). Otros tipos de PRR reconocen lectinas tipo C (*C-type lectin receptors*), β -glucanos y mananos ("*RIG-1-like receptors*" o RLR), dominios de unión a nucleótidos y los receptores NOD, de repeticiones ricas en leucinas o NLR (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing receptors*), con lo que, en resumen, a medida que se conoce mejor la familia de los PRR parece que la presión evolutiva ha hecho que se cubra una amplia gama de moléculas de patógenos (Abdullah and Knolle, 2014; Cao, 2016).

1.3 La Sinapsis Inmune

La presentación antigénica es la vía por la cual el sistema inmune innato activa el sistema inmune

adaptativo. Esta presentación, que se produce mediante el contacto de una APC cargada con un antígeno y un linfocito que reconoce de manera específica este antígeno. A este tipo de contacto se le conoce como sinapsis inmune (IS, *Immune Synapse*) por su similitud con las sinapsis nerviosas en términos de unión íntima de los dos tipos celulares y por el intercambio de información que se produce (Yokosuka and Saito, 2009).

1.3.1 Sinapsis inmune en linfocitos T

La IS es una estructura dinámica, la primera fase tiene lugar en un contacto temprano, MHC-TCR. Durante esta primera fase de la IS el linfocito T se “expande” o extiende sobre la APC, de forma que su zona de contacto aumenta y con esto también el número de complejos TCR-MHC los cuales se encuentran formando agrupaciones o “clusters” con moléculas co-estimuladoras como CD28, necesarias para una correcta activación del linfocito, tirosin-quinasa (ZAP70 y Lck), serín-quinasa (PKC) y proteínas adaptadoras (LAT, SLP76), las cuales llevan a cabo la transducción de la señal (Batista F. D. and Saito T. 2010) (Figura 1.2).

Todas estas moléculas se organizan en estructuras concéntricas denominadas complejos supramoleculares de activación, “*supramolecular activation clusters*, SMAC”, que se clasifican en periférica (pSMAC) y central (cSMAC). El pSMAC es una estructura rica en actina y moléculas adhesivas como integrinas (LFA-1 y sus ligandos ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, entre otras) que se cree ayuda a estabilizar la IS. En la parte central se localiza el cSMAC, donde se acumulan los complejos TCR-MHC y moléculas asociadas, como CD3, CD4, CD8 y CD28. Después de la fase de expansión, se produce una concentración de los complejos TCR en el cSMAC, y el pSMAC se reduce en tamaño. Es en esta fase cuando se considera la IS madura (Alarcón et al., 2011; Yokosuka and Saito, 2009).

Las IS, además de ser la plataforma de activación de los linfocitos, también permiten un intercambio de material e información entre la APC y el linfocito, por ejemplo, intercambiando vesículas (Gutiérrez-Vázquez et al., 2012; Martín-Cófreces et al., 2014; Mittelbrunn et al., 2015). Los linfocitos también pue-

Figura 1.2

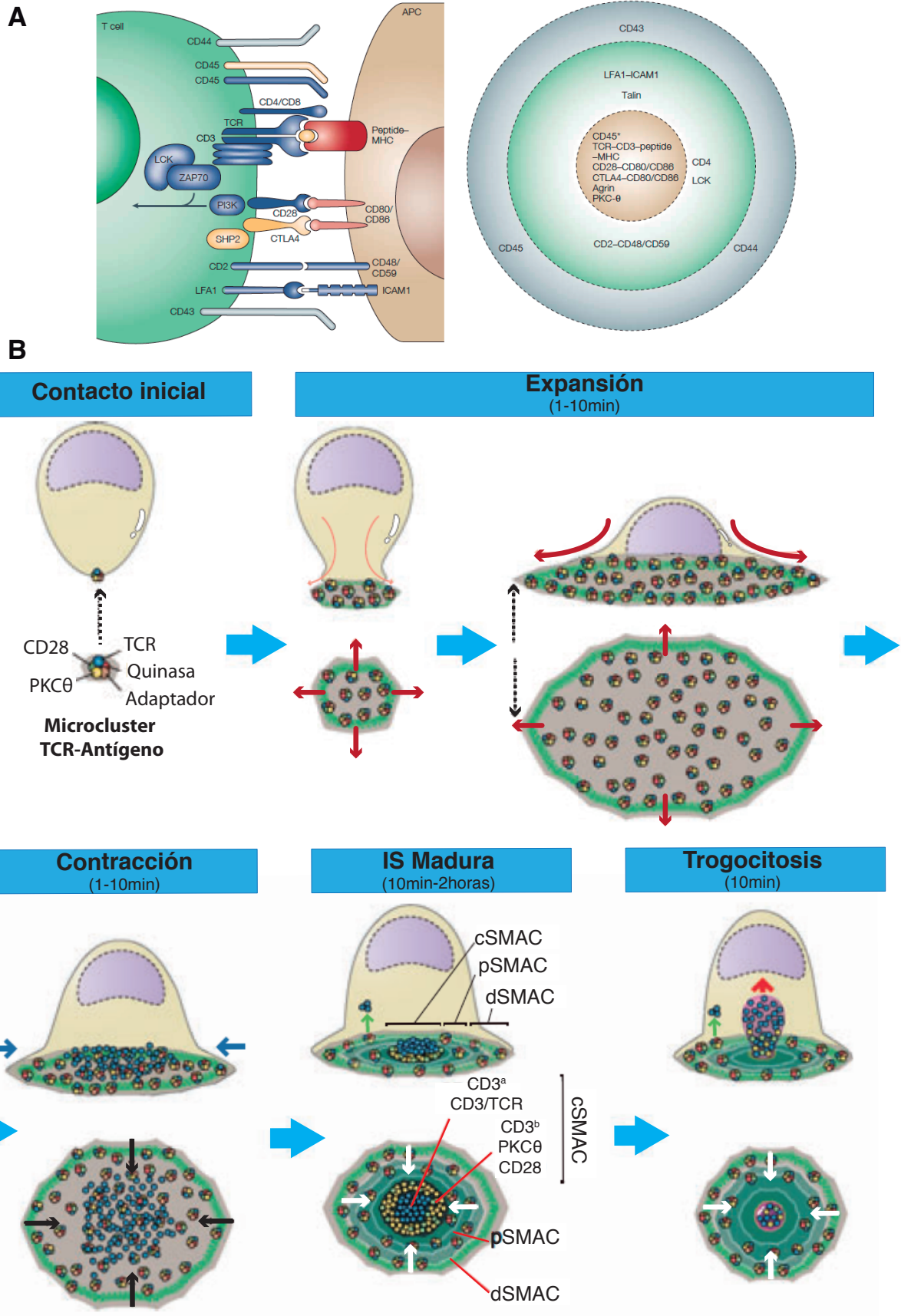


Figura 1.2 La Sinapsis Inmune (IS). La IS es una estructura compleja que se genera entre una APC y un linfocito T. Para que se forme la IS es condición indispensable el reconocimiento de antígeno por parte del linfocito en la superficie de la APC expuesto formando complejo con el MHC. **(A)** En una IS intervienen multitud de receptores y correceptores, a la vez que se orquesta en ambas células un reordenamiento del citoesqueleto de la célula. En el dibujo de la izquierda se muestra una visión simplificada de una IS madura. A la derecha se representa la misma IS en planta, para así poder observar las subestructuras que la forman, los conocidos como complejos de activación supramoleculares (SMAC). Se muestra en gris el dSMAC (SMAC distal, algunos autores lo consideran parte del pSMAC), en verde el pSMAC (SMAC periférico), y en marrón el cSMAC (SMAC central). **(B)** Aunque cada IS es diferente dependiendo TCR y su afinidad por el antígeno, o el microambiente celular, el proceso de formación y desmantelamiento de una IS sigue unas pautas que se describen en la figura: inicio, expansión, maduración y trogocitosis. En la fase de inicio se forman los primeros nanoclusters de TCR-Antígeno, dando lugar a la primera cascada de señalización que inicia el proceso de la IS; tras el primer contacto el linfocito cambia de morfología expandiéndose sobre la superficie de la APC, se cree que con el fin de formar el mayor número posible de complejos TCR-Antígeno; tras la expansión la IS experimenta una contracción o maduración en la que todos los complejos TCR-Antígeno tienden a centralizarse en el cSMAC; para terminar la fuerte unión entre el linfocito y la APC, y según algunos expertos se podría dar un proceso similar a una fagocitosis por parte del linfocito, arrancando éste parte de la membrana de la APC junto con sus receptores y complejos. La figura **(A)** proviene de *Johannes B. Huppa & Mark M. Davis 2003*. La figura **(B)** se ha realizado a partir de *Alarcon B A. Et al., 2011*.

den capturar trozos de membrana y citoplasma de la APC durante la formación de la IS por un mecanismo que se conoce como trogocitosis (Ahmed et al., 2009). Por este mecanismo, los linfocitos T pueden adquirir receptores y complejos de membrana de la APC, y aunque las posibles funciones de la trogocitosis no están claras, recientemente se han relacionado mecanismos similares en macrófagos con la captura de bacterias desde células infectadas (Steele et al., 2016). De acuerdo con estos datos, se sabe que la IS es usada por algunos virus (por ejemplo HIV o HCV) para invadir los linfocitos T desde DC infectadas (Geijtenbeek et al., 2000; Izquierdo-Useros et al., 2010).

1.4 Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo proporciona una respuesta más específica y efectiva frente a infecciones, y se activa por la propia inmunidad innata, por lo cual es más lenta en una primera respuesta. Este tipo de inmunidad genera memoria, siendo las respuestas secundarias mucho más rápidas y eficaces.

1.4.1 Respuesta inmune mediada por linfocitos T

Para profundizar en la respuesta mediada por linfocitos T hemos de distinguir los dos tipos clásicos de linfocitos T, CD8⁺ o CD4⁺. Ambos provienen de un mismo tipo de célula precursora conocido como linfocito doble positivo (CD4⁺ y CD8⁺). Los linfocitos doble positivos son seleccionados en el timo para ser CD4⁺ o CD8⁺ por su afinidad a la hora de reconocer el MHC, los que tengan más afinidad por el MHC-I serán CD8⁺ y los que posean más afinidad por el MHC-II serán CD4⁺. Tras su determinación a CD4⁺ o CD8⁺ son seleccionados por su auto-reactividad en el timo, aquellos que reaccionan ante péptidos propios mueren por apoptosis, para finalmente tener un repertorio de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no auto-reactivos capaces de reconocer una gran variedad de péptidos exógenos (Zheng and Rudensky, 2007). En teoría, más de 10¹³ antígenos diferentes pueden ser reconocidos por el Sistema inmune adaptativo (Nikolich-Žugich et al., 2004).

1.4.1.1 Linfocitos T CD4⁺

Tras su maduración en el timo, los linfocitos T CD4⁺ residen mayoritariamente en los SLO, donde pueden ser activados por APC que presenten antígenos reconocidos por los linfocitos. Actualmente se consideran necesarios 2 estímulos para la activación de las células T: el reconocimiento de antígeno a través del TCR-MHC, y el reconocimiento entre moléculas coestimuladoras (CD28-CD86 o CD80). Una vez activadas mediante las mencionadas señales, el linfocito sale de su estado virgen, no proliferativo, para entrar en una fase de activación y proliferativa. Esta activación linfocitaria hace que el linfocito pueda proliferar y para ello secrete IL-2, la cual actúa de manera autocrina. Una vez que recibe ambas señales, de activación y de proliferación, las células T CD4⁺ se diferenciarán a diferentes tipos celulares dependiendo del microambiente en el que se encuentran (Figura 1.3).

Figura 1.3

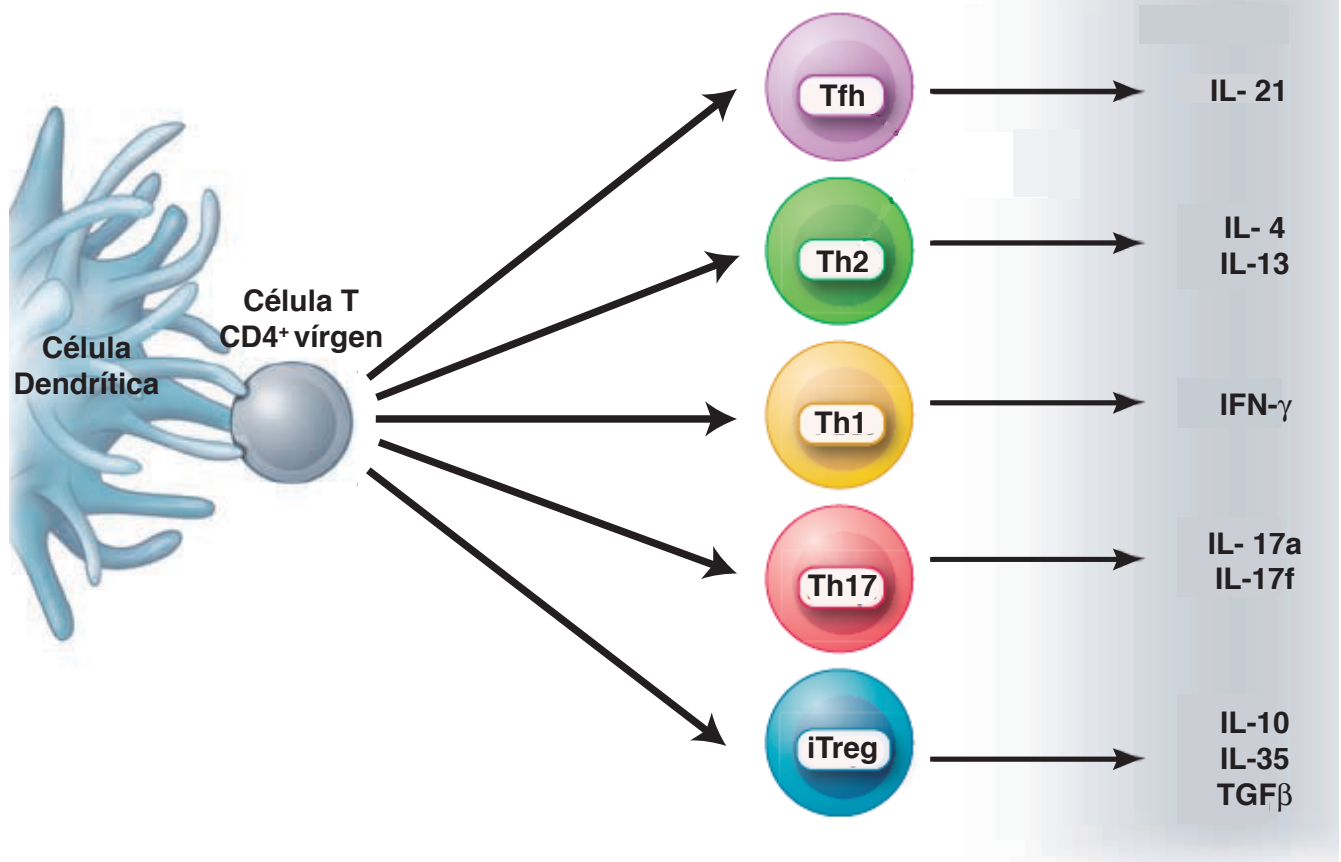


Figura 1.3 Diferenciación de linfocitos T CD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Th0) pueden diferenciarse en diferentes tipos de T helper (Th). Los diferentes tipos de Th se han clasificado según el patrón de citoquinas que producen mayoritariamente. Actualmente existen otros tipos de Th como el Th22 y Th9 recientemente descubiertos que no se incluyen en la imagen. Es de destacar la plasticidad que en los últimos estudios se hace evidente entre grupos de Th, dándose casos de grupos celulares que pasan de un tipo a otro bajo ciertas circunstancias. Figura basada en la original de O'Shea J.J. and Paul W.E. 2010.

Linfocitos T CD4⁺ Th1

Estos linfocitos generan típicamente una respuesta contra patógenos intracelulares (bacterias intracelulares o virus). Los linfocitos T CD4⁺ Th1 producen IL-2 con lo que se favorece la proliferación de linfocitos T CD8⁺ (activados paralelamente por APC), que pasan a ser linfocitos citotóxicos (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*) y ejercer su función citotóxica identificando células infectadas de su entorno y provocando apoptosis en las mismas (Abbas, 1996a; Abbas et al., 1996b).

Linfocitos T CD4⁺ Th2

La respuesta Th2 es una respuesta a patógenos extracelulares, mediante la cual se aumentan las barreras de defensa en las mucosas e induce la expulsión y/o muerte de los parásitos. Se han descrito también como mediadoras de las enfermedades alérgicas inflamatorias como son el asma, rinitis alérgica o la dermatitis atópica. El mecanismo por el cual logran los efectos mencionados son la secreción de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, las cuales, entre otros efectos, producen una polarización de la secreción de anticuerpos hacia un isotipo IgE, el cual se puede unir al receptor Fcε de granulocitos, mastocitos y basófilos (Abbas et al., 2015).

Linfocitos T CD4⁺ Th17

Abundantes en mucosas, zonas sensibles a infecciones por bacterias y hongos (Littman and Rudensky, 2010). Los principales atributos de esta subpoblación de linfocitos T CD4⁺ es su producción de IL-17A, IL-17A/F IL-10, IL-21, IL-22. Su función en la respuesta inmune no está totalmente clara debido a que hay varios tipos celulares productores de IL-17 como los linfocitos Tγδ, las células NK-like y las células inductoras de tejido linfoide (*lymphoid tissue inducer cells*, LTi) o ILC-3 (Martin-Orozco et al., 2009), con lo que resulta complejo diferenciar sus efectos concretos del resto de tipos celulares *in vivo*. Los estudios hasta el momento implican a esta población en el mantenimiento y defensa de las mucosas (producen reacción pro-inflamatoria), respuesta contra bacterias, reacciones de autoinmunidad y en procesos de regresión de tumores (Wu et al., 2009).

Linfocitos T CD4⁺ Tfh

Conocidos como linfocitos ayudantes foliculares o "*folicular helper T cells*" Tfh. Se caracterizan por la expresión de receptores ICOS (*inducible T-cell costimulator*), CD40L, CD134/OX40, PD-1 (*Programed death ligand-1*), BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*) y CD84, además del receptor para la quimioqui-

Introducción

na CXCL13 (CXCR5) y la producción de IL-21. Se encuentra en los SLO y son capaces de inducir el cambio de isotipo de los linfocitos B en los centros germinales (CG) de los LN donde tiene lugar la maduración final de los linfocitos B. Al activarse, la quimioquina CXCL13 les lleva a migrar al borde de la zona de linfocitos B de los SLO, donde contactan con éstas para producir CGs y más tarde el cambio de isotipo. Experimentalmente se ha demostrado que son inhibidas por las Tregs para suprimir su respuesta y la de los CGs (Wollenberg et al., 2011).

T reguladoras

Esta población de linfocitos, también conocida como Tregs, parecen jugar un papel crucial en autoinmunidad y supresión de las respuestas inmunes (Groux et al., 1997), de ahí su apodo de “reguladoras”, dado que su función principal parece ser la regulación de las respuestas inmunes. Las Tregs se diferencian desde edad muy temprana, y se caracterizan por tener los siguientes marcadores de superficie: CD4, CD25, OX40/CD134, CD27, CTLA-4, CD62-L y TGF- β . La aparición por estudios posteriores de nuevas subpoblaciones de Tregs han hecho que esta población que acabo de describir pase a denominarse “*natural*” Tregs o nTregs. Su depleción por mutación dirigida de los genes necesarios para su diferenciación lleva a una reacción global de autoinmunidad en ratón (Brunkow et al., 2001).

1.4.1.2 Linfocitos T CD8⁺

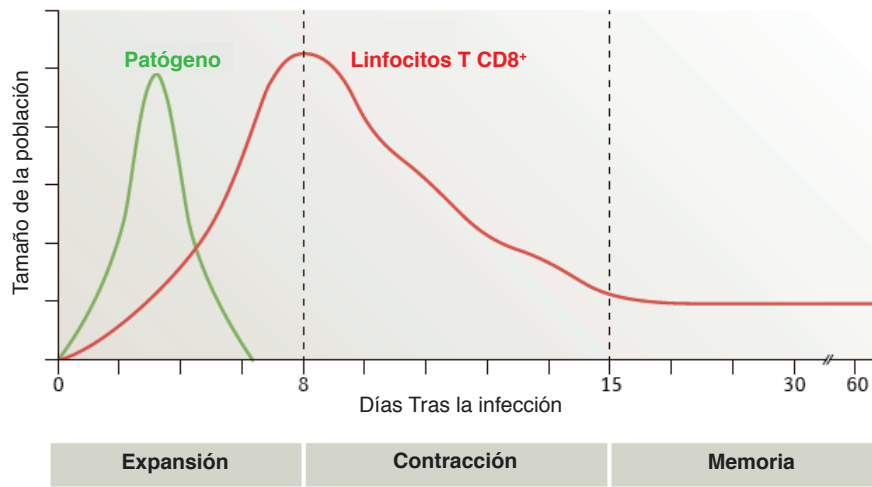
Los linfocitos T CD8⁺ se encuentran, mayoritariamente, en los SLO, aunque también hay poblaciones circulantes en sangre. Se encuentran en estado virgen o latente hasta que son activados por una APC (mayormente DC o, en algunos casos, linfocitos B). Se consideran necesarios 2 estímulos para la activación de las células T CD8⁺: el reconocimiento de antígeno a través del TCR-MHC-I, y el reconocimiento entre moléculas coestimuladoras (CD28-CD86 o CD80). Esta activación, por presentación antigénica, incluida la presentación cruzada es de una importancia vital no solo para la resolución de las infecciones, sino también en la respuesta inmune frente a tumores. Tras su activación, las células T CD8⁺, que pasan a denominarse linfocitos citotóxicos (CTL) adquieren capacidad citotóxica y son capaces de destruir

cualquier tipo celular que exprese el antígeno que reconocen (por su TCR). Nótese que prácticamente todas las células del organismo expresan MHC-I. Una vez encuentran el antígeno cargado en un MHC-I se produce lo que se ha conocido como el “beso de la muerte” o “death kiss” (Berke, 1995a). Este “beso” es realmente un contacto en el cual el CTL polariza y libera una gran cantidad de vesículas con enzimas citotóxicas (perforinas y granzimas) sobre la célula objetivo, eliminándola. Los CTLs logran pues reconocer células infectadas o cancerígenas y las eliminan (Berke, 1995b).

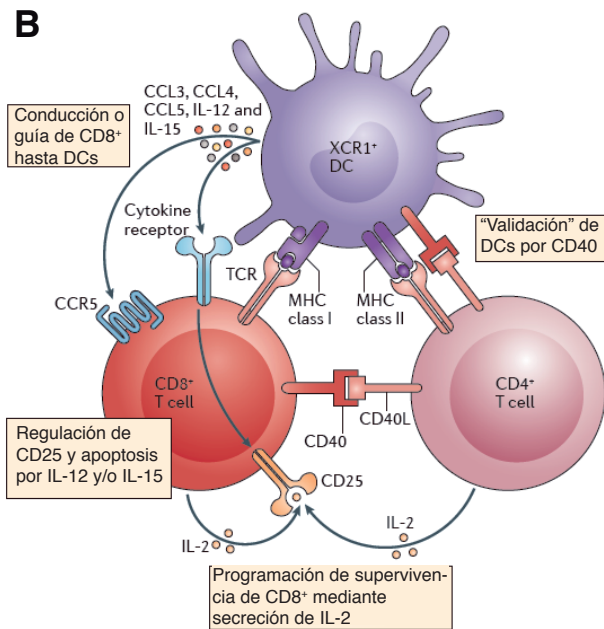
Una vez activados, los linfocitos CD8⁺ o CTL entran en una primera fase de expansión clonal en la que aumentan su número. Estos clones se diferencian en los denominados “*effector CD8⁺ T cells*” o linfocitos CD8⁺ efectores (T_{EFF}). Estos T_{EFF} son citotóxicos y proinflamatorios secretan IFN γ e IFN α . Tras resolver la infección la mayoría de los T_{EFF} entran en apoptosis y mueren, a esto se le ha denominado fase de contracción. No todos los T_{EFF} mueren, una pequeña subpoblación sobrevive para diferenciarse en células de memoria (Figura 1.4). El mecanismo por el cual se crea la población memoria de linfocitos T CD8⁺ no se conoce con exactitud, aunque si conocemos a sus participantes. Mediante experimentos con ratones transgénicos se ha descrito que los tipos celulares determinantes en la presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺ para su expansión y generación de memoria son las DC y linfocitos T CD4⁺. Se ha observado que los linfocitos T CD4⁺ son necesarios para la generación de las células de memoria T CD8⁺ (Janssen et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003). Sin embargo, el requerimiento indispensable de las células T CD4⁺ para este proceso es todavía un tema de debate (Laidlaw et al., 2016). Algunos autores indican que hay una primera presentación antigénica por parte de las DC a los linfocitos CD4⁺ que mediante la interacción CD40-CD40L capacita a la DC para que puedan activar a los linfocitos T CD8⁺ y generar esa población de memoria mediante un mecanismo desconocido (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Sin embargo, otros autores han observado la aparición de células T CD8⁺ de memoria durante infecciones en ausencia de dichas interacciones CD40-CD40L (Hamilton et al., 2001; Montfort et al., 2004; Whitmire et al., 1996). Mediante tecnologías de microscopía avanzada algunos estudios han arrojado luz sobre el orden de las interacciones en este proceso, primeramente, se activarían las DCs que llegarían al SLO para presentar y activar a los linfocitos T CD4⁺, tras lo cual se activarían los linfocitos T CD8⁺ (Hor et al., 2015).

Figura 1.4

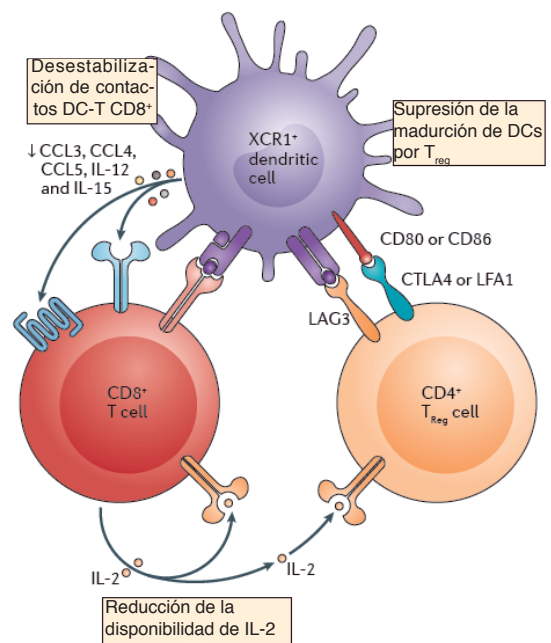
A



B



C



D

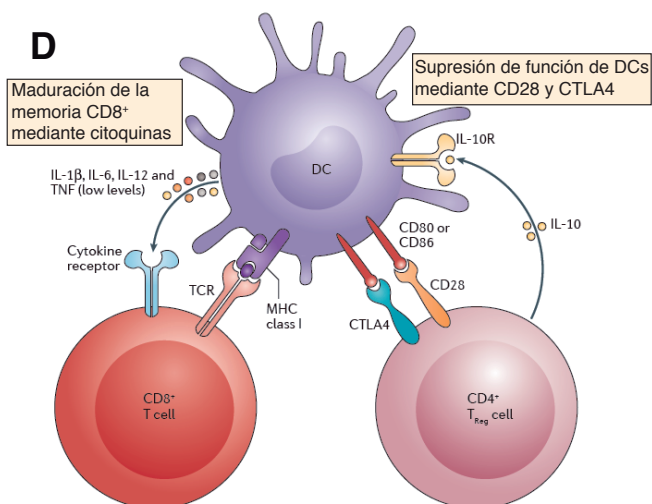


Figura 1.4 Visión clásica de la respuesta de linfocitos T CD8⁺. La respuesta de los linfocitos T CD8⁺ tiene lugar en un marco temporal desde la identificación del patógeno por reconocimiento antigénico hasta varios años después del encuentro con el mismo. A la activación por reconocimiento antigénico le sigue una fase de expansión que tiene su pico a los pocos días de la infección, luego la fase de contracción y finalmente una de memoria **(A)**. En la fase de expansión el modelo actual propone que las DC que migran a los LN se encargan de presentar los antígenos por MHC-I y MHC-II a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Estas señales sumadas a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las DC y la IL-2 secretada por los linfocitos al activarse promoverían la expansión de linfocitos T CD8⁺. El papel de las T CD4⁺ sería de células accesorias, las cuales “licencian” o “validan” mediante una interacción que implica CD40 a las DC **(B)**. En la fase de contracción se ha propuesto que las interacciones T CD8⁺-DCs se desestabilizan, la maduración de las DC se frena por Treg y la secreción de IL-2 se disminuye para frenar la expansión, todo encaminado a terminar con la reacción inmune **(C)**. En la fase de memoria el modelo actual propone que las DC validadas en anteriores estadios son las encargadas de, mediante la secreción de citoquinas y presentación de antígeno por MHC-I, seleccionar a los linfocitos T CD8⁺ para crear la memoria. El papel de los linfocitos T CD4⁺ en esta fase vuelve a ser accesorio para el mantenimiento de estas DCs validadas o licenciadas mediante la secreción de citoquinas e interacciones moleculares a nivel de superficie **(D)**. La figura se ha basado en Laidlaw et al. 2016.

Esta población de células T CD8⁺ que se convertirá en células de memoria expresa el marcador CD127 (receptor de IL-7) (Huster et al., 2004; Kallies, 2008). La población de linfocitos T CD8⁺ memoria se ha caracterizado, mediante marcadores y por su diferente comportamiento, en dos tipos: memoria central (*central memory* T_{CM}) CD44⁺ CD62L⁺ CCR7⁺ o memoria efectora (*effector memory* T_{EM}) CD44⁺ CD62L^{low} CCR7^{low}. Los T_{EM} tienen un fenotipo similar a los T_{EFF}, son capaces de diferenciarse rápidamente a T_{EFF} secretando gran cantidad de IFN γ y siendo altamente citotóxicas (Bachmann et al., 2005a; 2005b). En cambio, las T_{CM} se caracterizan por un fenotipo “progenitor”, menos diferenciado, pero poseen una mayor capacidad proliferativa y de auto-renovación, acompañado por una secreción alta de IL-2. Las T_{CM} también acaban expandiéndose y diferenciándose en T_{EFF} tras su activación, pero su diferenciación a T_{EFF} es más lenta (Sallusto et al., 2004). Ambos tipos de linfocitos T CD8⁺ memoria acaban dando lugar a T_{EFF}, pero con mayor potencial citotóxico que los producidos en una primera respuesta contra el antígeno, por esto la inmunidad adaptativa es más contundente, rápida y efectiva en respuestas sucesivas a un mismo antígeno (Figura 1.4).

La activación de los linfocitos T CD8⁺ es crucial en la respuesta contra patógenos intracelulares, tanto bacterias (como *Listeria monocytogenes*) como virus (citomegalovirus CMV). Por este motivo se ha usado de forma extensiva *Listeria monocytogenes* como bacteria modelo para el estudio de la respuesta T CD8⁺ (Khan and Badovinac, 2015).

Introducción

La activación de los linfocitos T CD8⁺ es también un mecanismo inmune crucial en la defensa contra tumores (Chapuis et al., 2012; Colluru and McNeel, 2016). Actualmente sabemos que una progresión del tumor o el establecimiento de una infección viral persistente se deben en parte a un mecanismo que actúa en los linfocitos T CD8⁺ denominado extenuación (“*exhaustion*”), que, funcionando en paralelo junto con el microambiente inmuno-supresor en el caso de los tumores (Chen and Mellman, 2013a), provocan un mal funcionamiento del sistema inmune. Se ha definido la extenuación como el proceso que, tras la activación inicial de los linfocitos T CD8⁺ y su conversión a CTLs, los lleva progresivamente a una pérdida de función. Actualmente se conocen varias vías y marcadores que modulan el mecanismo de extenuación, como son las proteínas CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), PD-1 (*Programmed death-ligand 1*), Eomes y el factor de transcripción Tbet (McKinney and Smith, 2016). El conocimiento de las vías de regulación de los mecanismos de extenuación y de inmunosupresión permite el abordaje de las patologías desde un nuevo enfoque. Este nuevo abordaje ha dado lugar a nuevas terapias para reactivar el sistema inmune contra tumores (Barber et al., 2005; Pauken and Wherry, 2015). Concretamente en humanos, se han aprobado los tratamientos contra PD-1 su ligando PD-1L y CTLA4, los cuales reactivan (en combinación con las terapias anticancerígenas clásicas) la inmunidad celular mediada por los CTLs provocando claramente beneficios en la supervivencia de los pacientes (Chen and Mellman, 2013b). Estas inmunoterapias, sin embargo, producen beneficios clínicos solo al 25%–30% de los pacientes y además en algunos tipos de tumores aparecen resistencias (D’Errico et al., 2016; Sharma et al., 2017).

El denominado micro-ambiente inmuno-supresor modifica la respuesta inmune, favoreciendo el crecimiento tumoral (Reeves and James, 2016). La lucha contra la inhibición del sistema inmune mediada por el microambiente tumoral ha dado lugar a las inmunoterapias descritas en el párrafo anterior y terapias celulares basadas en la capacidad presentadora de las DC (Sabado et al., 2016) que activan los linfocitos T CD8⁺ con capacidad antitumoral (Gannon et al., 2016; Klebanoff et al., 2006).

Otras inmunoterapias contra el cáncer también incluyen la modificación de las células T CD8⁺. Los

conocidos como CARs (*chimeric antigen receptors*) son linfocitos T CD8⁺ que expresan TCR modificados donde la parte exterior de la proteína se sustituye por una molécula de gran afinidad por antígenos tumorales (típicamente anticuerpos recombinantes), lo que provoca una respuesta exacerbada contra el tumor (Kochenderfer and Rosenberg, 2013; Kochenderfer et al., 2010).

1.4.1.3 Subpoblaciones “singulares”

Hasta aquí, se ha resumido la visión clásica del sistema inmune, separando inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Cabe destacar que en los últimos años se han descubierto varias poblaciones celulares que difuminan esta estricta separación. Por ejemplo, aunque en la visión clásica de la inmunología no se contempló la existencia de ningún tipo de memoria en el sistema inmune innato, se ha descrito un mecanismo que crea algo similar a una memoria inmune en macrófagos, a lo cual se ha llamado inmunidad entrenada (*trained immunity*). Éste mecanismo mejoraría la respuesta inmune innata frente a subsecuentes infecciones o ataques de un mismo patógeno, de forma similar a lo que se observa en la inmunidad adaptativa (Arts and Netea, 2016; Arts et al., 2016).

En paralelo, algunas poblaciones de linfocitos presentan características propias de la inmunidad innata como son: los linfocitos $\gamma\delta$, los linfocitos T invariantes asociados a mucosas y los linfocitos NKT invariantes. Los linfocitos $\gamma\delta$ son linfocitos con un TCR formado con cadenas $\gamma\delta$ en vez de $\alpha\beta$ como suelen tener los linfocitos T convencionales. Esta peculiaridad les confiere propiedades inusuales tales como la activación sin necesidad de APC, la capacidad de presentación antigénica vía MHC-II y la producción de TNF- α e IFN- γ , lo cual provoca una respuesta pro-inflamatoria y antibacteriana. Se encuentran en bajo porcentaje en el cuerpo de ratones y humanos, pero son especialmente abundantes en mucosas (Lanier, 2013; Romi et al., 2011). Los linfocitos T invariantes asociados a mucosas son también conocidos como MAIT (*Mucosal Associate Invariant T cells*), expresan un tipo peculiar de MHC-I no polimórfico denominado MR1. MR1 está codificado por unos genes muy conservados en la evolución, que parecen conferirles la capacidad de responder a microorganismos que contengan metabolitos de riboflavinas (Soudais et al., 2015; Treiner et al., 2003). Tras su activación producen una respuesta pro-inflamatoria mediada

Introducción

por TNF e IFN- γ y adquieren propiedades citotóxicas (Kurioka et al., 2014; Le Bourhis et al., 2013). Los linfocitos NKT invariantes o iNKT expresan un TCR α invariante que reconoce lípidos y glicolípidos presentados por CD1d (variante de MHC-I no polimórfica) (Borg et al., 2007). Tras su activación producen y secretan IFN- γ , IL-4 y TNF- α , y desarrollan las conocidas funciones de células NK como activación de linfocitos T, de linfocitos B, macrófagos y APC, y presentación cruzada de antígenos (Gapin, 2016).

Algunas bacterias patógenas (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*) son capaces de invadir linfocitos T convencionales *in vivo* (McElroy et al., 2009; Salgado-Pabon et al., 2013) y modificar el comportamiento de los linfocitos infectados (Salgado-Pabon et al., 2013). En contra de estas evidencias *in vivo*, los datos *in vitro* muestran una baja capacidad de infección directa de estas bacterias patógenas a linfocitos T CD4⁺ convencionales. De estos datos experimentales, parte esta tesis doctoral, tratando de resolver la ruta de entrada de las bacterias patógenas en los linfocitos T CD4⁺ convencionales. Las interacciones linfocito T-bacteria han sido pobremente estudiadas, y el rol de los linfocitos T CD4⁺ en la resolución de infecciones ha sido tomado como un dogma. Este dogma dicta que los linfocitos T ayudan a la resolución de la infección en trans, de forma indirecta, mediante la secreción de citoquinas tras su activación.

Como comienzo de esta tesis nos basamos en datos de otras especies patógenas. De acuerdo con estos datos, se sabe que la IS es usada por algunos virus (por ejemplo HIV o HCV) para invadir los linfocitos T desde DC infectadas (Bedoui et al., 2016; Geijtenbeek et al., 2000; Izquierdo-Useros et al., 2010), en esta tesis decidimos estudiar si también las bacterias eran capaces de infectar los linfocitos a través de la sinapsis inmune.

Objetivos

Esta Tesis doctoral describe un nuevo mecanismo de captura de bacterias por parte de los linfocitos T CD4⁺ convencionales, que eliminan estas bacterias, las procesan y presentan antígenos bacterianos activando linfocitos T CD8⁺ vírgenes, abriendo la posibilidad de su uso en terapias antitumorales.

1. Estudio y descripción del proceso de captura bacteriana por parte de las células T CD4⁺ convencionales: Transfagocitosis.
2. Estudio de la presentación antigénica (presentación cruzada) llevada a cabo por los linfocitos T CD4⁺ *tf in vitro*.
3. Análisis del papel fisiológico *in vivo* de la presentación cruzada mediada por los linfocitos T CD4⁺ *tf*: generación de células T CD8⁺ de memoria e implicaciones en inmunoterapias contra cáncer.

Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Ratones

Usamos ratones C57BL/6J control o “wild type”, C57BL/6-Transgénicos (TcraTcrb)^{425Cbn}/J OT-II cuyos linfocitos T CD4⁺ reconocen el péptido pOVA-II (ovoalbúmina 323-339; ISQAVHAAHAEINEAGR) en el contexto I-Ab (MCH-II) (Barnden et al., 1998), ratones C57BL/6-transgénicos (TcraTcrb)^{1100Mjb}/J OT-I cuyos linfocitos T CD8⁺ reconocen el péptido pOVA-I (ovoalbúmina 257-264; SIINFEKL) en el contexto H-2K^b (haplotipo de MCH-I) (Hogquist et al., 1994), ratones C57BL/6J 129S7-Rag1^{tm1Mom}/J (Rag1^{-/-}) (Mombaerts et al., 1992), carentes de linfocitos (B y T) que fueron comprados a Jackson Laboratory (stock nº 004194 y 003831 respectivamente). Ratones transgénicos AND-TCR cuyos linfocitos reconocen un péptido de citocromo C de polilla (88-103; ANERADLIAYLKQATK) también conocido como MCCp en el contexto I-Ek, (Kaye and Ellenberger, 1992), cedidos por el doctor Balbino Alarcón del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO). Ratones C57BL/6J 129S2- Tap1^{tm1Arp}/J (Tap-1^{-/-}), TAP1 KO (Van Kaer et al., 1992) cedidos por la doctora Margarita del Val, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO).

Las colonias de ratones se mantuvieron en un espacio libre de patógenos en la unidad SPF (Specific-pathogen-free) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) o bien en la unidad SPF del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Los procedimientos experimentales realizados a todos los animales implicados en esta tesis doctoral han sido aprobados por el comité ético de experimentación animal de la Universidad Autónoma de Madrid, CNB y CNIC respectivamente. Todos los experimentos fueron conducidos respetando las Guías para el Bienestar y Salud Animal españolas y europeas. Los procedimientos fueron aprobados por la autoridad competente (Comunidad Autónoma de Madrid) con el número de proyecto PROEX 431/15.

3.1.2 Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos contra las proteínas de ratón CD69, CD25, CD4, CD8, CD11c, IA/IE, Gr1, CD3, PD-1, CD127, CD44, CD62L (*BD e Immunostep*), anticuerpos biotinilados anti CD45.1, CCR-7, CD3, CD4, CD8, CD28, IgM, B220, CD19, MHC clase II (I-Ab), CD11b, CD11c DX5, CD25 y CD16/CD32 (*BD e Immunostep*), y FITC anti-tubulina (*Santa Cruz*). Los anticuerpos contra LFA-1 (M17/4) y CD3 (Sánchez-Madrid et al., 1983) fueron donados por el grupo del Prof. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa). Otros anticuerpos usados fueron: el anticuerpo monoclonal 25-D1.16, conjugado a aloficocianina (APC), específico para el péptido SIINFEKL/H-2Kb (*eBioscience*), anti-TAP-1 (M-18), -ERK-2, lamina B (*Santa Cruz*), y anti-ovoalbúmina (generosamente donado por el Dr. David Sancho (CNIC)). Los anticuerpos secundarios generados en burro anti-ratón y en cabra anti-hamster conjugados a AlexaFluor488, 647, o 568 se adquirieron de *Life Technologies*; los anticuerpos generados en cabra, anti-ratón y anti-conejo acoplados a peroxidasa fueron comprados a *Thermo Scientific*.

Se usaron anticuerpos que reconocen las proteínas humanas HLA-DR, CD3, CD1a, DC-SIGN, CD14, TCR cadena V β 8 (*BD*). Anticuerpo biotinilado anti-DC-SIGN y anti-CD1a (*Miltenyi Biotec*), anti-LFA-1 (CD18), -Lia 3/2 y -CD43 (HP2/21) (generosa donación del Prof. Francisco Sánchez-Madrid) (Sanchez-Mateos et al., 1995; Serrador et al., 1998). El anticuerpo anti-DC-SIGN conjugado a Alexa 647 se compró a AbD Serotec.

Los anticuerpos que reconocen bacterias incluidos los anti-*S. enterica*, anti-*S. aureus* y anti-*L. monocytogenes* se compraron a *ABD Serotec*.

3.1.3 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Listeria monocytogenes* (EGD; BUG600), *L. monocytogenes* *cGFP* (BUG2539) (Balestrino et al., 2010), *L. monocytogenes*-OVA (pPL2-LLO-OVA) (Brockstedt et al.,

Materiales y Métodos

2004), y su isogénica *L. monocytogenes* 10403S. *Salmonella enterica* sv *enteritidis* 3934 (Solano et al., 2002). *S. enterica*/pGFPmut3 (que expresa la proteína verde fluorescente)(Kroupitski et al., 2009), *Staphylococcus aureus* 132, *S. aureus*/pCD47-GFP (que expresa la proteína verde fluorescente), *S. aureus* 132 Δ srt (mutante en sortasa y por lo tanto no patogénico; (Charpentier et al., 2004; Cormack et al., 1996; Vergara-Irigaray et al., 2009). Cepas de *Escherichia coli* DH5 α y *E. coli* Dh5 α /pGFPmut3.

Las bacterias se crecieron en BHI (*Listeria* y *Staphylococcus*) o LB (*Salmonella* y *Escherichia*) con los correspondientes antibióticos para la selección cuando era necesario (10 μ g/ml eritromicina o bien 100 μ g/ml ampicilina).

3.1.4 Otros materiales

Los péptidos pOVA-I (SIINFEEKL) y pOVA-II (ISQAVHAAHAEINEAGR) se sintetizaron en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO), y en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB). El péptido de Citocromo C de polilla (*moth cytochrome C*; MCCp) 88-103 (ANERADLIAYLKQATK) adquirido a GenScript. Otros materiales usados fueron, superantígeno E de *Staphylococcus* (SEE, *Toxin Technologies*), GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) de ratón (*Preprotech*), GM-CSF humano (*Agrenvec*), IL-4 humana (*R&D Systems*), LPS (Lipopolisacárido) (*Sigma-Aldrich*), microesferas cubiertas de estreptavidina (Miltenyi Biotec), faloidina acoplada a Alexa Fluor 568 (*Invitrogen*), poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*), micro-esferas fluorescentes “FluoSpheres” de 1 μ m diámetro recubiertas con biotina (*Invitrogen*), cloruro de amonio (inhibidor de la acidificación de los endosomas), 1400W (inhibidor de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) (*Sigma-Aldrich*). Pepstatina A (inhibidor de las proteasas ácidas, específicamente, las aspartil peptidasas), MnTBAP (mimético de la superóxidodismutasa, inhibidor de las especies reactivas de oxígeno (ROS), NAC (N-acetil cisteína; inhibidor de ROS) y L-NAME (análogo de la arginina que inhibe la producción de óxido nítrico (NO)) fueron cedidos por los doctores J. Serrador (CBM-SO), J. L. Rodríguez (CIB) y M. Ortiz de Landazuri (Hospital de la Princesa).

Otros reactivos fueron, estreptavidina acoplada a PercP (*BectonDickinson*), CellTrace Violet,

AlexaFluor568-faloidina (ambos de *Life Technologies*), 7AAD, marcador de viabilidad (*eBiosciences*), y el colorante celular *Live/Dead Fixable* (*Thermo Fisher scientific*).

3.2 Métodos

3.2.1 Selección negativa de linfocitos de ratón

Los linfocitos primarios T CD4⁺ o T CD8⁺, fueron obtenidos desde una suspensión celular proveniente de los ganglios linfáticos (LN; *Lymph nodes*) y bazo de los ratones indicados. Las suspensiones celulares fueron incubadas con anticuerpos que reconocen otros tipos celulares diferentes a los que se pretende purificar, es decir, en el caso de linfocitos T CD4⁺ (α DX5, α CD8, α CD11c, α CD11b, α Gr-1, α B220, α CD19, α IgM) y para linfocitos T CD8⁺ vírgenes (α DX5, α CD4, α CD11c, α CD11b, α Gr-1, α B220, α CD19, α CD25, α IgM). Tras esta incubación, se lava el exceso de anticuerpos por centrifugación y se incuba la misma suspensión de células con microesferas acopladas a estreptavidina. Se elimina el exceso de microesferas por centrifugación, y se procede a la selección magnética negativa de las células usando un auto-MACS Pro Separator (*Miltenyi Biotec*), que retendrá, gracias a un sistema de imanes, las células unidas a las microesferas, liberando las células no unidas. La pureza de las muestras obtenidas se analizó siempre por citometría de flujo.

3.2.2 Aislamiento y diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón

Las células dendríticas de ratón fueron generadas de acuerdo al método básico descrito en (Inaba et al., 1992), con algunas modificaciones. Las médulas se sacaron de tibias y fémures de ratones C57BL/6

Materiales y Métodos

de 8-20 semanas de edad. Las células rojas se lisaron con una solución hipotónica y la suspensión celular se lavó y se filtró con un poro de 70 mm para eliminar restos celulares. Las células de la médula ósea se sembraron en placas de cultivo P150 (placas de poli-estireno hidrofílico de 150mm de diámetro) en una concentración de 5×10^5 células/ml en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamina (2mM), 2 Mercaptoetanol (5×10^{-5} M) y GM-CSF (20ng/ml). El medio se reemplazaba por medio fresco y suplementado con GM-CSF cada 2 días. Las características fenotípicas de las células resultantes fueron definidas por citometría de flujo a día 9-10 (CD11c⁺, Ia-Ie⁺ y Gr1⁻). Las DC se activaron añadiendo lipopolisacárido (LPS) 20ng/ml al medio 24 horas antes de su uso.

3.2.3 Aislamiento de células primarias derivadas de sangre periférica de origen humano

Se purificaron monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por un paso de adherencia a placa de cultivo celular de 30 min a 37°C + 5%CO₂, en RPMI suplementado con 10% FBS. Los monocitos se diferenciaron hacia células dendríticas siguiendo el protocolo descrito en (Lanzavecchia and Sallusto, 1994). Brevemente, los monocitos fueron cultivados en RPMI + 10% FBS suplementado con IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (500 U/ml). Las células se cultivaron 6 días renovando las citoquinas cada 48 horas, para así obtener una población inmadura de DC humanas. Las características fenotípicas de las DC (HLA-DR⁺, CD3⁻, DC-SIGN⁺, CD14⁻, CD1a⁺) se analizaron por citometría de flujo. Estas DC se activaron añadiendo LPS (1 µg/ml) al medio de cultivo 24 horas antes de su uso.

Los linfocitos de sangre periférica se aislaron de PBMCs mediante dos rondas de adhesión en placa de cultivos celulares P6 (Placas de poli-estireno hidrofílico de 60mm de diámetro por pocillo de la marca *BD Falcon*). El enriquecimiento en linfocitos Vβ8⁺ (que responden a SEE) se consiguió mediante el cultivo durante 7 días en presencia de 0,1 µg/ml de SEE. Los estudios se realizaron de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el comité ético local para la investigación básica. Las muestras humanas pertenecen a voluntarios humanos cuyo consentimiento ha sido otorgado, y provienen del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

3.2.4 Transfagocitosis

Las células dendríticas derivadas de médula ósea; BM-DC (*Bone Marrow Dendritic Cell*) de ratón o las DC derivadas de monocitos de sangre periférica humana se decoraron con 10 µg/ml de pOVA-II o 1 µg/ml de SEE respectivamente (para facilitar la transfagocitosis) y se infectaron 1 hora con las bacterias indicadas (típicamente se usó una MOI de 20). También se usaron DC sin decorar con antígenos como controles. A continuación, se redujo el número de bacterias extracelulares realizando 4 centrifugaciones a baja velocidad (260 g). Estas DC infectadas se incubaron después con linfocitos humanos enriquecidos en Vβ8⁺ o linfocitos T CD4⁺ de ratón (OT-II, o los ratones indicados) obtenidos por selección negativa. Se incubaron los conjugados DC/linfocito durante 1h, 24h o 48h según los experimentos. En el caso en el que se dejaron los conjugados más de tres horas, se añadió gentamicina al medio (100 µg/ml) para evitar el crecimiento bacteriano. Tras esto, los linfocitos se re-aíslaron por *sorter* (*FACS Synergy*; *iCyt*). En algunos experimentos, las BM-DC y los linfocitos T CD4⁺ se aislaron de ratones transgénicos AND que expresaban los haplotipos de MHC-I H-2K^b, o H-2K^k. En estos experimentos las BM-DC se decoraron con el péptido MCCp para mejorar la transfagocitosis.

Para determinar el papel de la presentación antigénica y analizar la necesidad de contacto físico entre las células durante la transfagocitosis, los conjugados DC-T se realizaron en varias condiciones, en la presencia o ausencia de péptido pOVA-II y de una barrera física entre ambos tipos celulares (filtro de policarbonato con un poro de 3 µm; *Costar*). Como control se hicieron en paralelo infecciones directas de los linfocitos (MOI= 10). La transfagocitosis se analizó luego por ensayos de supervivencia a gentamicina (ver más adelante) y citometría de flujo. En los experimentos donde se usaron anticuerpos contra LFA-1, éstos se añadieron sobre las DC 15 min antes de la formación de los conjugados con linfocitos, para impedir la formación de la sinapsis inmune.

En los ensayos de transfagocitosis medidos por citometría de flujo, los linfocitos T CD4⁺ de ratón se

Materiales y Métodos

tiñeron con CMAC (7-amino-4-clorometilcoumarin; *Invitrogen*) para su identificación. Las DC de ratón se marcaron con anti-CD11c-PE (Ficoeritrina). Las DC humanas se marcaron con anti-DC-SIGN-Alexa Fluor 647, y los linfocitos T humanos con anti-V β 8-PE. Las bacterias extracelulares se detectaron usando anticuerpos antes de la permeabilización y la fijación de las células. Las bacterias totales (intracelulares + extracelulares) se identificaron por la expresión de GFP por parte de la bacteria o usando anticuerpos anti-bacteria tras fijar y permeabilizar las muestras. Los fluoróforos usados para detectar las bacterias intracelulares y totales fueron diferentes, de tal forma que se pueden identificar fácilmente las bacterias intracelulares (marcadas un fluoróforo) de las extracelulares, marcadas los dos fluoróforos. Las muestras fueron analizadas usando un *FACSCanto flow cytometer* (*BD Biosciences*) y los resultados se evaluaron usando el software *FlowJo* (*Tree Star*). La misma aproximación experimental se aplicó al usar las micro-esferas, que se detectaron con estreptavidina-PE.

3.2.5 Ensayo de supervivencia a gentamicina

Los ensayos se realizaron adaptando el método descrito en (Tham et al., 2009; Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P., 2010), y se basan en la capacidad de la gentamicina de eliminar sólo las bacterias extracelulares, ya que al no atravesar la membrana de las células eucariotas, las bacterias intracelulares quedan protegidas del antibiótico. En los experimentos de cuantificación de la transfagocitosis, se añadió gentamicina (100 μ g/ml) a los linfocitos T transfagocíticos (y también a las DC) y se incubaron durante 1 hora a 37°C en una atmosfera con saturación de humedad y que contenía 5% CO₂. A continuación, se lavó la gentamicina por centrifugación (3 lavados), se contaron las células y se lisaron en PBS en presencia de 0,05% v/v Triton X-100 (*Sigma*). Se realizaron diluciones seriadas 1:10 en PBS y se sembraron 25 μ l de cada dilución en placas de LB-Agar o BHI-Agar según la bacteria. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C durante 24-48 horas tras lo cual se contaron las colonias. Cada colonia corresponde a una bacteria intracelular (unidades formadoras de colonias; UFC).

Los linfocitos transfagocíticos se separaron de las DC por selección negativa. La pureza de la selección

negativa se comprobó en cada experimento por citometría de flujo para sustraer a posteriori las UFC de la posible contaminación de DC. Solo se tuvieron en cuenta los experimentos con purezas >95%, y se les restaron las UFC correspondientes al porcentaje de DC contaminantes.

3.2.6 Preparación de muestras primarias para criomicroscopia de rayos X

Se llevó a cabo un ensayo de transfagocitosis por linfocitos T CD4⁺ usando bacterias transgénicas que expresaban GFP (*Listeria GFP* y *Salmonella GFP*). Los conjugados DCinfectadas-T se sembraron en rejillas de microscopía (Au-HZB2 y AU-G200F1) recubiertas de “quantifoil” (*gold quantifoil R 2/2 holey film microscopy grids*), una capa de carbono monoatómica que proporciona un soporte adecuado para las células. La capa de carbono “quantifoil” a su vez se cubrió con poli-L-lisina para favorecer la adhesión celular. Tras 30 min de incubación a 37°C (5%CO₂) para favorecer la adhesión de los conjugados al quantifoil, los conjugados se vitrificaron en las rejillas por la técnica de “plunge and freezing” en un aparato Leica EMCPC, sumergiéndolas en etano líquido, que permite un enfriamiento más rápido que el nitrógeno líquido, evitando la formación de cristales en las muestras, manteniéndolas así en su estado nativo (Chichon et al., 2012).

Tras la vitrificación, las rejillas se mantuvieron siempre por debajo de -196°C, en nitrógeno líquido. La localización de los eventos de interés en la rejilla (aquellos conjugados que presentaban una o varias bacterias cerca de la sinapsis inmune), identificados gracias a la fluorescencia de las bacterias, se llevó a cabo usando un aparato hecho *ad hoc* para este proyecto por LINKAM, que permite visualizar muestras mantenidas en nitrógeno líquido en un microscopio de fluorescencia; Zeiss Axio Scope en nuestro caso. Tras mapear las rejillas vitrificadas y localizar los eventos de interés en las mismas, éstas se enviaron a las líneas de rayos X suaves U41-TXM (Schneider et al., 2012) y a Mistral (Pereiro et al., 2009) en los sincrotrones BESSY II (Berlín) y ALBA (Barcelona) respectivamente. El esquema de adquisición es similar en ambos microscopios, usando rayos-X con una energía de 510eV -520eV, las proyecciones de rayos-X se tomaron a temperatura de nitrógeno líquido, variando la inclinación de la muestra 1° en cada

proyección.

El alineamiento y reconstrucción de las imágenes fueron realizadas tal y como se describe en (Chiappi et al., 2016; Chichon et al., 2012).

3.2.7 Ensayo de citotoxicidad específica

Las células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) fueron preparadas a partir de linfocitos T CD8⁺ vírgenes (de un ratón OT-I) activadas por linfocitos T CD4⁺tf *Listeria-OVA* (durante 7 días). Como control positivo se usaron linfocitos T CD8⁺ OT-I activados por esplenocitos cargados con pOVA-I en paralelo durante los 7 días.

Células EL-4 (línea linfoblástica de ratón que expresa H-2K^b) se incubaron con 0,5mM de pOVA-I (EL-4-pOVA-I) (o sin péptido, EL-4) durante una hora. Las células se lavaron mediante centrifugación, y se incubaron con dos concentraciones diferentes de CellTrace Violet. Las EL-4-pOVA-I se marcaron con 5mM y las EL-4 con 0,5mM con el fin de poder diferenciar ambas poblaciones por citometría de flujo. Las dos poblaciones de EL-4 se mezclaron y se incubaron con los CTL a diferentes ratios (5:1, 2:1, 1:1 y 0,5:1) durante 4 horas, para finalmente analizar la fluorescencia de CellTrace Violet en las poblaciones por citometría de flujo. Para calcular la citotoxicidad específica se usó la fórmula: $1 - (\%EL-4 \text{ CellViolet}^{\text{high}} / \%EL-4 \text{ CellViolet}^{\text{low}}) \times 100$ (Lang et al., 2002). La citotoxicidad relativa fue calculada sustrayendo la citotoxicidad específica del control negativo (células EL-4 sin CTLs), el cual mide la muerte espontánea.

3.2.8 Purificación de linfocitos T CD4⁺ por “*sorting*”

Los linfocitos T CD4⁺ transfangocíticos, tras su contacto con DC infectadas, se recogieron y resuspendieron en PBS con FcBlock (α CD16 y α CD32) (2,5 μ g/ml; *ImmunoStep*) para bloquear los receptores Fc, y se incubaron durante 25 min con anticuerpos anti-CD4-APC y anti CD11c-PE. Se lavaron y resus-

pendieron en medio óptimo para la separación celular por *sorting* (PBS, 1% FBS, HEPES (20mM), EDTA (5mM), gentamicina (100µg/ml)) y fueron separadas en un FACS Synergy iCyt (Sony). La pureza de esta separación celular se analizó para cada experimento por citometría de flujo, y nunca estuvo por debajo del 99%. Las células tras el *sorting* fueron recogidas en PBS, 50% FBS.

3.2.9 Inmunofluorescencia de muestras primarias

Las células analizadas en medio RPMI, 10%FBS, se depositaron sobre cristales cubreobjetos de microscopía recubiertos de poli-L-lisina ($\sim 4 \times 10^5$ células/cubreobjeto). Tras la adhesión, (30 min) se fijaron las muestras usando paraformaldehído (PFA) 3% en PBS (30 min). Una vez fijadas las muestras se bloquearon con FcBlock (α CD16 y α CD32) de ratón (*ImmunoStep*) o de humano (100 mg/ml de γ -globulina). Las muestras se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS durante 4 min. Dependiendo del experimento los linfocitos o las DC se marcaron con CMAC, o CellTrace Violet. La actina se detectó usando Faloidina acoplada a diferentes fluoróforos. Las muestras se visualizaron usando un microscopio confocal *Leica* TCS-SP5 equipado con una lente HCX PL APO CS 63x/1.4 de apertura numérica, y controlado por el software *Leica* LAS AF. Las imágenes se analizaron con el software libre ImageJ (NIH; Bethesda, MD).

Los linfocitos T CD4⁺tf y los linfocitos T CD8⁺ (previamente teñidos con CellTrace Violet) fueron incubados durante 1 o 3 horas para propiciar la formación de IS. Después, las muestras se permeabilizaron (0,1% Triton X-100 en PBS) y se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y faloidina para ser visualizadas y analizadas como se ha descrito en el párrafo anterior.

3.2.10 Vídeo microscopia de células vivas

Las DC infectadas con bacterias transgénicas que expresan GFP (*Listeria GFP* y *Salmonella GFP*) se depositaron en placas de cultivo equipadas con cristales (portaobjetos) de microscopía en el fondo, tratados con poli-L-lisina para favorecer la adhesión de las células al cristal. Se cubrieron con medio de cultivo (HBSS, 2% FBS) que permite una correcta visualización de las muestras evitando la fluorescencia de algunos colorantes presentes en los medios de cultivo. Las DC se incubaron junto con los linfocitos T CD4⁺ marcados con CMAC. La formación de conjugados se siguió usando a un microscopio de epifluorescencia y campo claro (DMIRE2; *Leica*) con un objetivo 63x (Na, apertura numérica 0,95) de inmersión en aceite. Se usó un sistema de iluminación por LEDs (CoolLED pE excitation system) controlado por el software *Leica MM AF* (basado en *Metamorph*). La temperatura, 37°C, y concentración de CO₂ (5%) se mantuvieron constantes usando el sistema TEMPcontrol 37-2 y CTI-controller 3700 (*Leica*).

3.2.11 Análisis de la producción de citoquinas de linfocitos CD4⁺tf

Las DC decoradas con pOVA-II infectadas con o sin *Listeria monocytogenes* se pusieron en contacto con linfocitos T CD4⁺ OT-II en un ratio 1:1 (DC:T). Se mantuvieron los conjugados DC:T durante 24 horas. Las DC resultaron tremendamente dañadas por la infección, al contrario que los linfocitos T, que mayoritariamente siguieron intactos como revelan los datos usando yoduro de propidio (datos no mostrados). Se re-aislaron por selección magnética negativa los linfocitos y seguidamente se activaron con 5µg/ml de anti-CD3 y 2µg/ml de anti-CD28 durante 72 horas. 6 horas antes de la medición de citoquinas se estimularon con 50ng/ml de Forbol miristato-acetato (PMA) y se recogieron los sobrenadantes para la cuantificación de citoquinas. La cuantificación de las citoquinas secretadas al medio se realizó mediante un kit comercial para la medición específica de citoquinas de ratón mediante la técnica conocida como “*citometric bead array*” o CBA descrita previamente en (Morgan et al., 2004; OMahony et al., 1998).

3.2.12 Agregación celular usando anti-CD43

Los conjugados T-DC fueron llevados a cabo durante 30 min en tres condiciones diferentes: con anti-CD43, con anti-IgG (control isotipo), o bien con PBS. Tras la incubación, se añadió DTT (ditiotritol, 100mM) para favorecer la desaparición de los agregados celulares, seguido de vortex intensivo. Finalmente se aislaron los linfocitos T CD4⁺ por selección magnética negativa, y se midieron las UFC por ensayo de supervivencia a gentamicina.

3.2.13 Protección *in vivo* de linfocitos T CD4⁺ frente a infecciones primarias de *Listeria monocytogenes*

Se inyectaron vía intravenosa (iv) a ratones recipientes WT cuatro cócteles diferentes de células: 1) linfocitos T CD4⁺ OTII transfagocíticas (*Listeria-OVA*); 2) linfocitos T CD4⁺ OT-II; 3) linfocitos T CD4⁺ WT; 4) PBS. 24 horas después se infectaron todos los ratones con *Listeria-OVA* (30.000 bacterias/ratón iv). Finalmente, 48 o 72 horas después de la infección se sacrificaron los ratones y se contaron las UFC de bazo e hígado mediante su triturado y siembra en placas de BHI-Agar en condiciones de esterilidad.

3.2.14 Ensayos *in vitro* de proliferación de linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD4⁺ con *Listeria*-WT (como control) o *Listeria*-OVA fueron purificados por sorter e incubados como APC con linfocitos T CD8⁺ vírgenes OT-I (ratio 1/1). Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratones transgénicos OT-I fueron previamente teñidos con CellTrace Violet para cuantificar su proliferación mediante citometría de flujo (*FACSaria*, BD). En cada división celular la población

Materiales y Métodos

proliferativa pierde intensidad de fluorescencia, lo que se observa en el citómetro como un movimiento de la población en dirección al origen del eje X del histograma (Filby et al., 2015). Solo las células vivas (con tinción negativa para 7AAD) fueron analizadas. Como control positivo, los linfocitos T CD8⁺ OT-I se incubaron con DC decoradas con OVAp-I, con DC infectadas con *Listeria-OVA* o bien con una combinación de anticuerpos contra CD3 (5µg/ml pegado a placa) y CD28 (soluble 2µg/ml), correspondiente a una activación policlonal.

3.2.15 Ensayos *in vivo* de proliferación de linfocitos T CD8⁺

- **1.** Para analizar la proliferación inducida por los linfocitos T CD4⁺tf *in vivo*, 5 x 10⁶ linfocitos T CD8⁺ vírgenes (de ratones transgénicos OT-I/CD45.1⁺) fueron teñidos con CellTrace Violet e inyectados i.v en un ratón recipiente WT (CD45.2⁺ C57BL/6). 24 horas tras la inyección, los linfocitos T CD4⁺tf (*Listeria*-WT o *Listeria*-OVA) fueron transferidos a los ratones recipientes. 3 días tras la segunda inyección, los ratones fueron sacrificados y sus bazo procesados para medir la proliferación de las células T CD8⁺ transferidas mediante citometría de flujo.

- **2.** Para probar la existencia de la transfagocitosis y presentación antigénica por parte de los linfocitos T CD4⁺ en el contexto de una infección bacteriana *in vivo*, realizamos un experimento de trasplante de médula ósea (*bone marrow transplantation*, BMT). Ratones WT (C57BL/6) se irradiaron con 10Gy y se trasplantaron con 3,8 x 10⁶ células de médula ósea de ratones H-2K^k. Después de 30 días, se comprobó en sangre periférica la correcta reconstitución de las células donadoras, testando la presencia de H-2K^b. A continuación, se aislaron por sorting linfocitos T CD4⁺ de ratones transgénicos AND de dos fenotipos diferentes (H-2K^b o H-2K^k) (4 x 10⁶ células/ratón), linfocitos T CD8⁺ de ratones transgénicos OT-I/CD45.1⁺ (4 x 10⁶ células/ratón) y se transfirieron adoptivamente a los ratones reconstituidos junto con el péptido MCC (15mg/ratón). Los linfocitos T CD8⁺ aislados de los ratones transgénicos OT-I/CD45.1⁺ fueron teñidos con CellTrace Violet antes de ser transferidos a los ratones recipientes. A las 24h

de la transferencia adoptiva de las células, los ratones recipientes se infectaron iv con *Listeria-OVA* (10^4 bacterias/ratón). Tras 5 días de infección, los ratones fueron sacrificados y sus bazos procesados para cuantificar por citometría de flujo la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ (CD45.1⁺).

3.2.16 Análisis de linfocitos CD8⁺ T memoria durante la infección de *Listeria monocytogenes* *in vivo*

Se dividieron los ratones recipientes Rag-1^{-/-} en tres grupos experimentales. 1) Inyectados iv con linfocitos T CD8⁺ vírgenes (5×10^5) de ratones WT ; 2) Inyectados con 5×10^5 linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratones WT y 5×10^5 linfocitos T CD4⁺ de ratones TAP1 KO; 3) Inyectados con 5×10^5 linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratones WT y 5×10^5 linfocitos T CD4⁺ de ratones WT. Los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ inyectados fueron previamente aislados por sorting de bazos de los ratones donantes (99% pureza).

Un día después de la transferencia de las células, los ratones recipientes se infectaron i.v con *Listeria-WT* (1000 bacterias/ratón). De cada grupo experimental se sacrificaron varios animales (n=5) a días 5, 12 y 30 tras la infección; los bazos de éstos animales fueron procesados para analizar el fenotipo de la población de linfocitos T CD8⁺ por citometría de flujo. Se tiñeron con anticuerpos contra CD8, CD3, CD62L, CD44, CD127, PD-1 y CCR-7 conjugados a diferentes fluorocromos y con un marcador de viabilidad.

Algunos ratones de los 3 grupos experimentales se enfrentaron a una segunda infección de *Listeria-WT* i. v (5×10^4 bacterias/ratón). 48 horas tras la infección se sacrificaron los ratones y se cuantificaron las UFC de aisladas de bazo e hígado de *Listeria-WT* en placas de BHI-Agar.

3.2.17 Prueba de concepto de linfocitos T CD4⁺tf como agentes anti tumorales (melanoma B16-OVA)

A ratones recipientes WT (C57BL/6) se les inyectaron subcutáneamente, en su flanco derecho, células B16-OVA (5×10^5 células/ratón). B16-OVA es una línea de melanoma de ratón que expresa la ovalbúmina. Estos ratones recipientes se dividieron en 3 grupos a los que se les inyectaron iv: grupo 1, PBS (control negativo), grupo 2, linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT (5×10^5 células/ratón), y grupo 3, linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA (5×10^5 células/ratón). A todos los grupos se les transfirieron además linfocitos T CD8⁺ OT-I vírgenes vía iv (10^3 células/ratón). El crecimiento de los tumores se midió cada 2-3 días con un calibre, y el área se calculó multiplicando la longitud y la anchura de cada tumor. Los grupos experimentales se mezclaron aleatoriamente en jaulas y las mediciones fueron realizadas sin el conocimiento de los grupos ni ratones, en forma de doble ciego. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor llegó a 300 mm², en acuerdo con los criterios de punto-final de las directrices europeas para experimentación con animales.

3.2.18 Western-Blotting

Se realizaron *SDS-PAGE* y *Western-Blotting* usando los procedimientos estándar.

3.2.19 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se han realizado usando el software *GraphPad Prism*. Cuando los datos se ajustaron a una curva de distribución normal, y se analizaron dos grupos experimentales, se usó la prueba de T de Student para comparar las medias de los dos grupos. Cuando se analizaron más de dos grupos

experimentales, se usó el análisis de varianza ANOVA y la comparación múltiple de medias fue corregida con la prueba de Bonferroni. Las diferencias entre grupos han sido consideradas significativas a partir de valor $p < 0,05\%$. Los datos se representan siempre con la desviación estándar (SD) de al menos 3 experimentos.

En cuanto a los experimentos de respuesta frente a tumores (Figura 4.21), para probar si el tratamiento con linfocitos T CD4⁺tf (*Listeria* OVA) reduce de forma significativa la probabilidad de desarrollar un tumor (reducción significativa en la razón de probabilidades), usamos el test exacto de Fisher unilateral (*one-sided Fisher's exact test*) para probar la independencia del recuento de tumores y el tratamiento recibido (tratamiento; *Listeria*-OVA + linfocitos T CD4⁺tf, o controles; PBS vehículo o *Listeria*-WT + linfocitos T CD4⁺tf). La hipótesis de que la razón de probabilidades es la misma bajo ambas condiciones (controles y tratamiento *Listeria*-OVA + linfocitos T CD4⁺tf) fue rechazada con un valor p de 0,004525.

Resultados

4.1 Los linfocitos T CD4⁺ convencionales no fagocitan bacterias directamente

Este proyecto comienza por la existencia en la bibliografía de algunos casos documentados de bacterias en el interior de linfocitos T *in vivo*. Los autores proponían que los linfocitos podrían ser un reservorio de infección, pero no se determinó el mecanismo de entrada o el destino de los linfocitos infectados (McElroy et al., 2009; Salgado-Pabon et al., 2013). Para comenzar la búsqueda del mecanismo de entrada de bacteria en los linfocitos decidimos testar la capacidad fagocítica de las células T, ante la ausencia de datos en la bibliografía. Con este propósito diseñamos un experimento en el cual pusimos linfocitos T CD4⁺ (seleccionados negativamente de bazo y ganglios de un ratón C57BL/6J (WT)), vírgenes o activados, en contacto directo con diferentes bacterias patógenas *in vitro* (*Salmonella enteritidis* (Gram negativa), *Listeria monocytogenes* (Gram positiva) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva)).

La entrada de las bacterias (fagocitosis o infección) en los linfocitos T se cuantificó mediante ensayos de supervivencia a gentamicina (Tham et al., 2009; Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P., 2010). Este es un ensayo clásico de microbiología que se ha usado extensivamente para cuantificar la entrada bacteriana en las células eucariotas. Se basa en el uso de gentamicina, un antibiótico aminoglucósido que no atraviesa las membranas celulares eucariotas, por lo que sólo ataca a las bacterias extracelulares, dejando las intracelulares intactas. Así, cada colonia observada, tras sembrar en placas de Petri los lisados de linfocitos infectados en presencia de gentamicina, se correspondería con una bacteria intracelular (más detalles en materiales y métodos). Los resultados muestran la incapacidad de los linfocitos T CD4⁺ (vírgenes o activados) de ratones WT, de fagocitar bacterias de forma directa (Figura 4.1 A-C). Como control positivo usamos células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC, *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) de ratones WT.

Repetimos el experimento en un sistema de células humanas aisladas de concentrados de sangre periférica. A partir de estos concentrados sanguíneos obtuvimos células dendríticas (DC) y linfocitos T de un mismo donante, los enfrentamos a las mismas condiciones de infección directa que las descritas en el experimento con células de ratón, añadiendo algunos controles de líneas celulares humanas; HeLa, línea

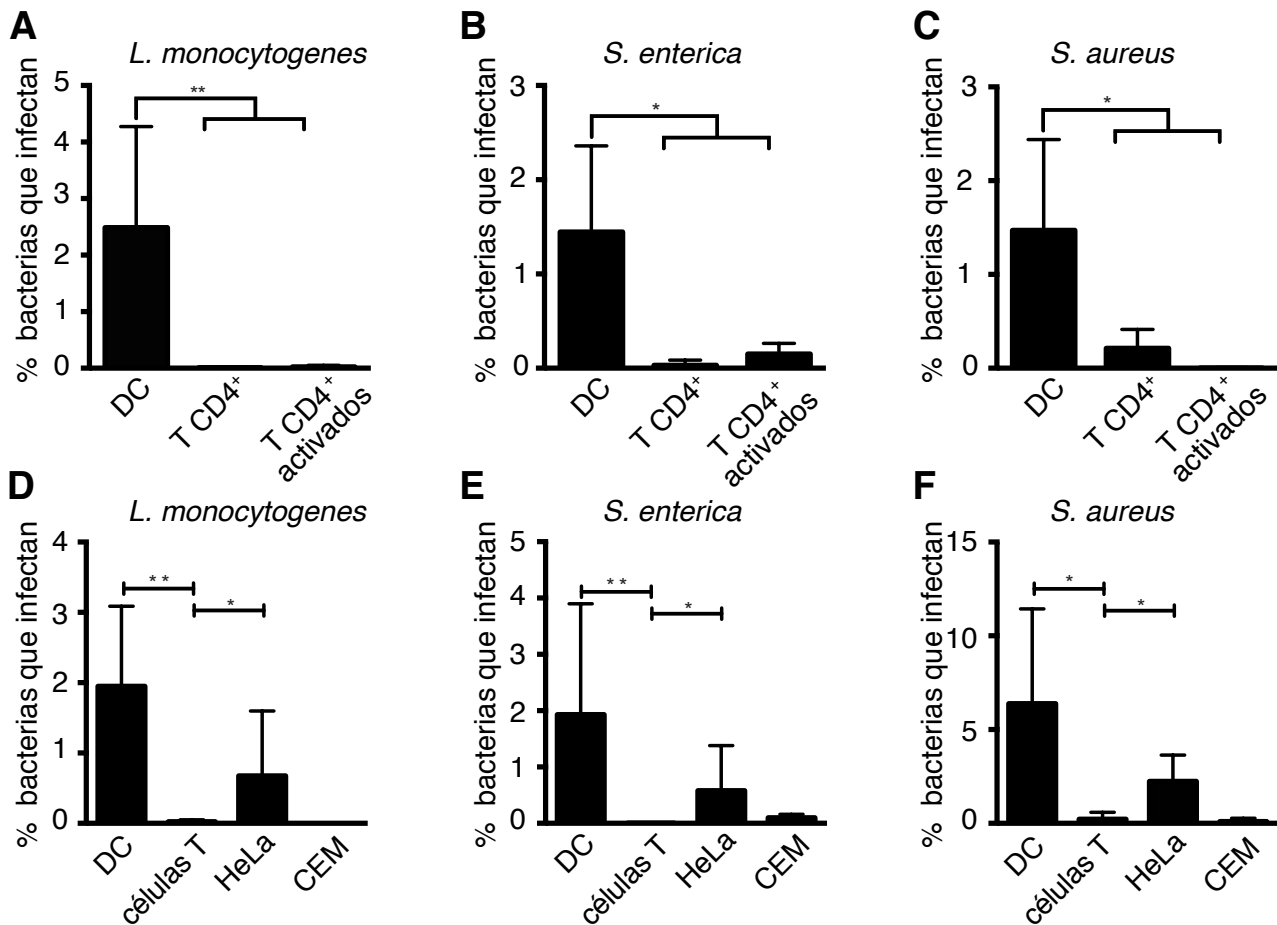
Figura 4.1

Figura 4.1 Infección directa en linfocitos. (A-C) Se infectaron linfocitos T y células dendríticas (BMDCs) de ratón con las bacterias indicadas usando una MOI de 20 durante una hora. Se usaron linfocitos vírgenes o activados polyclonalmente con anticuerpos anti CD3 y anti CD28. La infección se cuantificó realizando un ensayo de supervivencia a gentamicina. Los resultados se expresaron en % de bacterias intracelulares. (D-F) El mismo procedimiento experimental se aplicó a cultivos de células primarias aisladas de sangre periférica de donantes humanos. Las líneas celulares de origen humano HeLa y CEM fueron introducidas como controles.

epitelial previamente descrita como susceptible a la infección (Sansonetti et al., 1986) y CEM (CCRF-CEM, *Human T cell lymphoblast-like cell line*) una línea de linfocitos (Ramirez-Santiago et al., 2016) (Figura 4.1 D-F). Los resultados se asemejan a los obtenidos en ratón, siendo los linfocitos T refractarios a la infección de forma directa, mientras que los controles positivos, las DC y células HeLa (células epiteliales) sí que fueron infectadas. La línea linfoblástica CEM tampoco resultó infectada.

4.2 Las bacterias fagocitadas por BMDC se polarizan a las sinapsis inmunes

Nuestros resultados *in vitro*, donde mostramos que los linfocitos son refractarios a la entrada bacteriana, no concuerdan con las observaciones de bacterias infectando linfocitos T *in vivo* (McElroy et al., 2009; Salgado-Pabon et al., 2013). Para cuadrar las observaciones *in vivo* e *in vitro*, generamos una hipótesis según la cual debería de existir un tipo celular que fuera el “vehículo” de los agentes infecciosos, el cual facilitase la entrada de estas bacterias en los linfocitos. En favor de ésta hipótesis, se había descrito que el HIV o el virus de la hepatitis C usan las células dendríticas (DC) como vehículo desde el que infectan de manera más eficiente a sus células diana, los linfocitos (Geijtenbeek et al., 2000; Izquierdo-Useros et al., 2010).

Para testar la hipótesis donde los linfocitos capturarían bacterias por transinfección desde las DC infectadas, realizamos experimentos infectando BMDC previamente activadas con LPS (para aumentar la expresión de moléculas relacionadas con la presentación antigénica (Hill et al., 2007)). Tras la infección se lavaron las BMDC mediante centrifugaciones a baja velocidad, para eliminar el exceso de bacterias extracelulares y disminuir la posibilidad de que las bacterias proliferaran en el medio y se incubaron con linfocitos T CD4⁺ aislados de ratones transgénicos OT-II, que reconocen el péptido (ISQAVHAAHAEI-NEAGR, procedente de la proteína ovoalbúmina 323-339; pOVA-II). Además, las BMDC infectadas se decoraron con OVAp-II, para facilitar la formación de la IS. Ambos tipos celulares se pusieron en contacto durante 30 min, tras lo que las muestras se procesaron para su análisis por microscopía confocal (Figura 4.2 A-F). Se observó (a tiempos cortos de contactos celulares) una clara polarización de las bacterias a la zona de contacto (la IS) entre BMDC y linfocitos T CD4⁺. Esto se confirmó por video microscopía de células vivas (Vídeo 1).

Repetimos los mismos experimentos en el sistema de células humanas. A partir de concentrados sanguíneos, aislamos linfocitos (*peripheral blood lymphocytes*, PBLs), y monocitos. Las DC humanas se

Figura 4.2

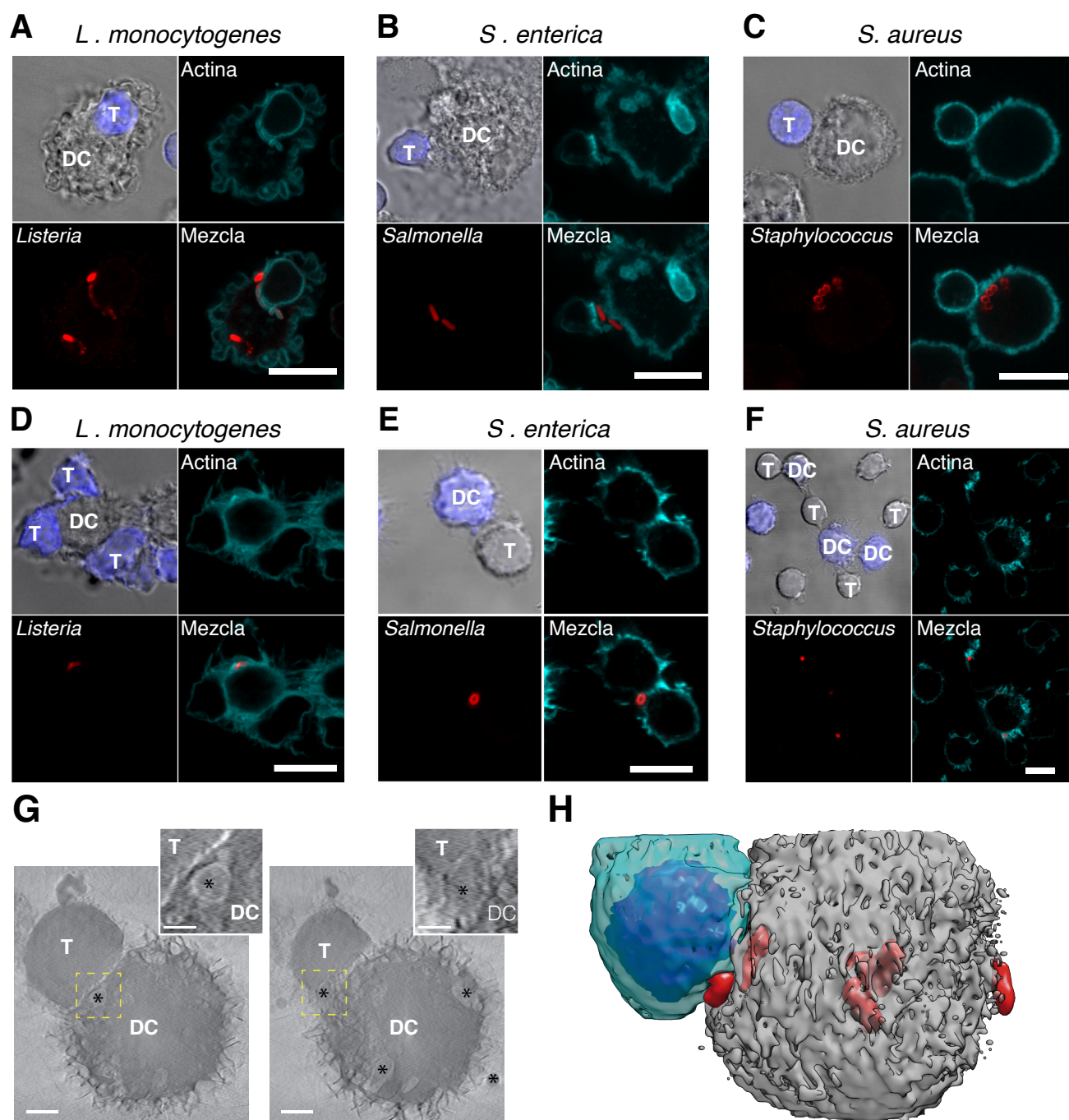


Figura 4.2. Polarización de las bacterias hacia la IS. (A-C) Imágenes de microscopía confocal de DC decoradas con pOVA-II (no teñidas), infectadas con las bacterias (rojo), formando conjugados durante 30 min con linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II (azul). La actina celular detectada usando faloidina fluorescente se muestra en cian. (D-F) Imágenes de microscopía confocal similar a los mostrados en A-C, pero con células de origen humano. Las DC aisladas de sangre periférica se decoraron con SEE, se infectaron con las bacterias indicadas y se pusieron en contacto con linfocitos T enriquecidos en T CD4⁺ que expresan las cadenas V β 8 del TCR (reconocen el SEE). La actina se muestra en cian, las bacterias en rojo. EL marcaje con CellTrace Violet (azul) se usó en algunos casos para marcar las DC y en otros para marcar los linfocitos. (G-H) Imágenes de crío-tomografía rayos X donde se muestra una DC infectada con *S. enterica* contactando con linfocitos T CD4⁺ (células de ratón). (G) Tomogramas de una IS donde se aprecian las bacterias (*S. enterica*, marcadas con *). Se amplían las bacterias en la zona de contacto entre APC infectada y linfocito T, donde se observa una de las bacterias (imagen de la izquierda) en el canal sináptico entre las dos células y como la célula T emite proyecciones que rodean a la bacteria. (H) Reconstrucción en 3D de los tomogramas. Las bacterias se muestran en rojo, la DC infectada en gris o translúcida, y el linfocito T CD4⁺ en azul, con núcleo en azul más oscuro. Las barras en A-F corresponden a 10 μ m, y en G a 2 μ m.

diferenciaron a partir de los monocitos añadiendo GMCSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e interleuquina 4 (IL-4) al cultivo celular durante 6 días. Los PBLs se activaron añadiendo al cultivo celular superantígeno E (SEE), procedente de *Staphylococcus aureus* e IL-2. La presencia de SEE enriquece la población de linfocitos que expresan TCR del tipo V β 8 (que reconoce el SEE). Cabe destacar que de cada donante se obtienen ambas poblaciones y no se cruzan con muestras de otros donantes para evitar el rechazo por compatibilidad de donantes. Los cultivos primarios de humano se trataron de forma similar a los de ratón en cuanto a la activación de las DC, infección y lavados salvo que en el sistema de células humanas, las DC se decoraron con SEE para favorecer la formación de IS con los linfocitos T CD4⁺ V β 8 (Figura 4.2 D-F). Los resultados son muy similares a los obtenidos en el modelo de ratón, las bacterias se polarizan hacia la IS en los contactos DC-Linfocito.

Además, decidimos explorar una nueva técnica aún no estandarizada, la crío-tomografía de rayos X. Ésta técnica de microscopía posee una resolución mayor que la microscopía confocal, evita los artefactos debidos a la fijación y corte de muestras como ocurre en otras técnicas de microscopía de alta resolución, y además permite la visualización de las muestras en 3D (Chiappi et al., 2016; Chichon et al., 2012). La técnica se basa en el alto contraste que la materia orgánica ofrece a su exposición a los rayos X suaves “*soft-X-rays*” (fotones en el rango de energía cercanos a los 543eV). La resolución para muestras biológicas está en el entorno de los 50 nm, pero en los últimos años se han hecho grandes avances tanto

en el procesamiento de muestras biológicas como en los algoritmos que alinean las imágenes de cada tomograma, llegando a resoluciones de 20-30nm (Hanssen et al., 2010; 2011). Una de las ventajas de esta tecnología se basa en que el contraste de las muestras biológicas es suficiente para su visualización, sin necesidad de añadir agentes de contraste. Las muestras biológicas se pueden observar pues en su estado nativo, sin alteraciones debidas a la exposición a agentes químicos. Por el contrario, esta tecnología tiene aún algunas limitaciones. Se tienen que observar las muestras en microscopios que tienen como fuente de luz un sincrotrón, ya que los fotones que se necesitan han de ser muy “brillantes”, es decir una gran cantidad de fotones por área y tiempo, y esto actualmente solo se consigue en un sincrotrón. Además, el espesor de las muestras no debe de ser superior a 10 μm . Al no ser una técnica estandarizada, la preparación de las muestras debe de ser puesta a punto y el tiempo que lleva desde la preparación de las muestras hasta que se obtiene un tomograma es aun excesivo (meses). Nuestros experimentos, además de confirmar la polarización de las bacterias hacía la IS, han ayudado a la puesta a punto de esta nueva tecnología. Las muestras deben crionizarse de forma rápida (en nuestro caso usamos etano líquido), y luego se han de mantener en temperaturas cercanas a los -170°C . Con nuestro trabajo contribuimos al diseño de una cámara que mantiene las muestras sumergidas en nitrógeno líquido y que se puede acoplar a un microscopio óptico y así visualizar las muestras antes de ser llevadas al sincrotrón. Mostramos una reconstrucción 3D de un contacto linfocito T CD4^{+} -DC (Figura 4.2 G-H y vídeo 1 y 4). Podemos ver una polarización parecida de bacterias a la IS, y además una bacteria en el canal sináptico empezando a ser rodeada por “pseudopodos” de la célula T (Figura 4.2 G y H y vídeo 2 y 5).

4.3 Los linfocitos T CD4^{+} convencionales capturan bacterias desde DC infectadas

Repetimos los experimentos de microscopía confocal prolongando los tiempos de los contactos dendrítica-linfocito para examinar el posible paso de bacterias desde las DC a los linfocitos T CD4^{+} , tal y como sugiere la imagen de crío-microscopía de rayos X. Además, analizamos el paso de bacterias desde las DC a los linfocitos por vídeo-microscopía de fluorescencia en células vivas usando bacterias que ex-

Figura 4.3

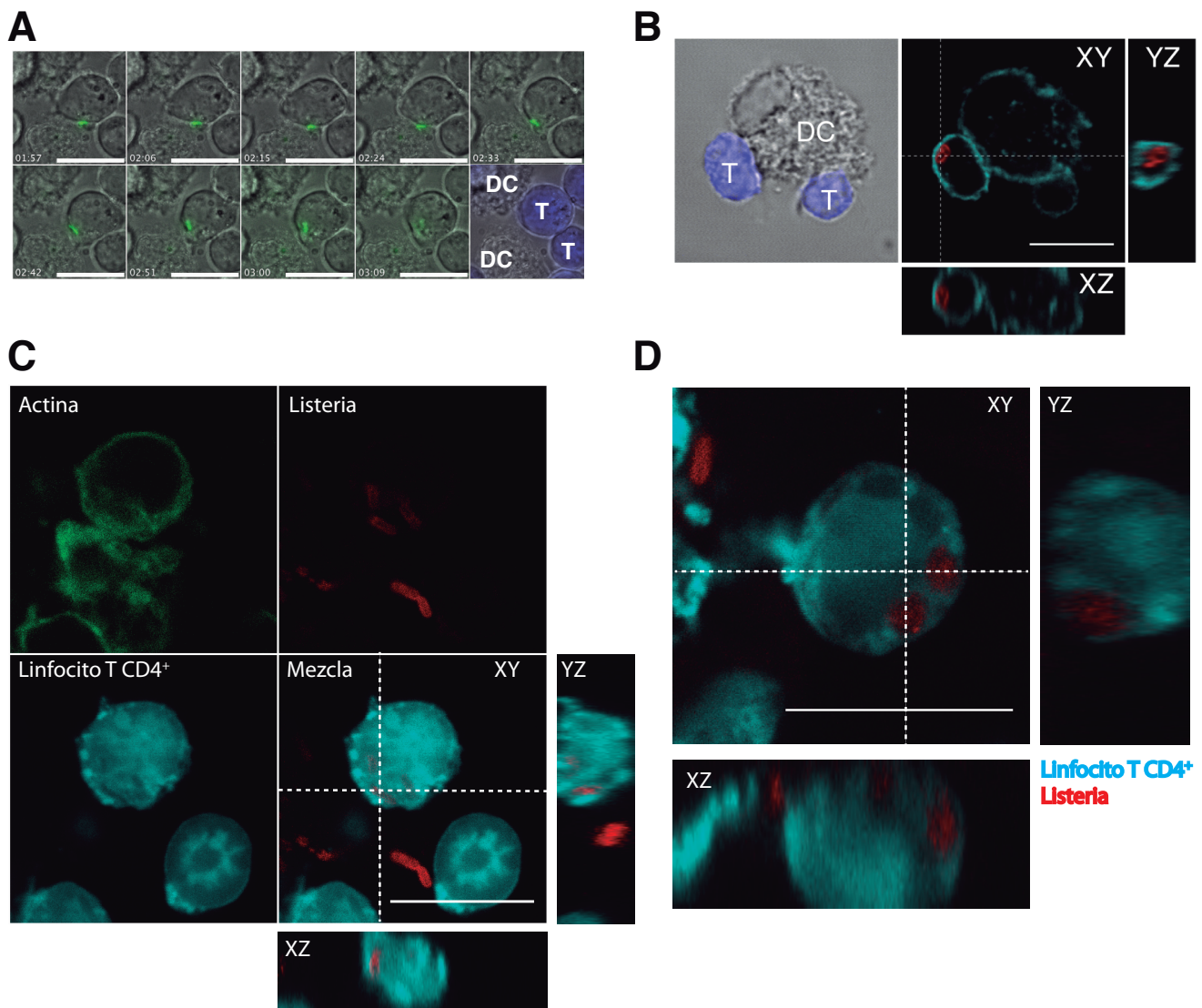


Figura 4.3. Los linfocitos capturan bacterias desde DC infectadas. **(A)** Fotogramas a partir del vídeo 2 de microscopía sobre células vivas. Las DC infectadas (no teñidas en el fotograma final) con *Salmonella*-GFP (verde) y decoradas con SEE se pusieron en contacto con linfoblastos T teñidos con CellTrace Violet (azul en el fotograma final). El tiempo se muestra en minutos y segundos. **(B)** Imagen de microscopía confocal donde se observa el contacto entre una DC humana infectada con *Salmonella* entérica con dos linfocitos T CD4⁺ tras 3h de contacto entre ambos tipos celulares. En las imágenes ortogonales, a partir de los cortes indicados por las líneas discontinuas, se observa claramente la presencia de bacterias en el interior del linfocito T. Se muestra la actina en cian detectada con faloidina fluorescente. **(C-D)** Imágenes de microscopía confocal de DC de ratón (no teñidas) infectadas con *Listeria monocytogenes* (rojo) que han estado formando conjugados durante 3 horas con linfocitos T CD4⁺ teñidos con CellTrace Violet (cian). Se muestra actina en verde **(C)**. Las líneas punteadas indican los planos de corte ortogonales, XZ e YZ. Las barras de escala representadas representan siempre 10 μ m.

presaban la proteína verde fluorescente (GFP) (*Salmonella*-GFP y *Listeria*-GFP) (Figura 4.3 A y Vídeos 1-3). En el vídeo 1 se puede ver una clara polarización de una bacteria (*Salmonella*-GFP) mientras que en los vídeos 2 y 3 la polarización es seguida de un paso desde la DC al linfocito T. La captura de bacterias por parte de linfocitos se corroboró por microscopía confocal (Figura 4.3 B-D). En las imágenes de microscopía confocal podemos apreciar mediante planos ortogonales cómo las bacterias están dentro del cuerpo celular del linfocito T. Además, podemos observar cómo las bacterias parecen deformarse, incluso degradarse, en el interior del linfocito T CD4⁺ (Figura 4.3 D).

Los datos anteriores indican que, aunque los linfocitos T CD4⁺ no son capaces de fagocitar bacterias directamente, sí pueden capturar bacterias de forma indirecta, usando a las DC infectadas como vehículo. Para cuantificar este proceso, diseñamos un experimento de supervivencia a gentamicina que nos permitió analizar el papel que podría jugar el contacto directo célula-célula y la presentación antigénica usando los dos sistemas, células humanas y de ratón. Usamos diferentes condiciones; pusimos en contacto DC infectadas y linfocitos T CD4⁺ en presencia o ausencia de antígeno (OVAp-II en el caso de ratón y SEE en el de humano). Para testar el papel del contacto célula-célula, además, se impidió el contacto entre las DC infectadas y los linfocitos T CD4⁺ usando una barrera física (filtro de policarbonato de 3µm de diámetro de poro; *Transwell*, TW). Tras 30 minutos de incubación se añadió gentamicina a todas las condiciones, durante una hora. Cuando las DC y linfocitos habían tenido un contacto físico directo, se aislaron los linfocitos T CD4⁺ por selección magnética negativa. Los linfocitos T CD4⁺ de todas las condiciones se lisaron y se sembraron diluciones seriadas de los lisados en placas de Petri con BHI- o LB-Agar (según la bacteria usada) para posteriormente contar las colonias (cada colonia se correspondería a una bacteria intracelular). Como control negativo, se llevó en paralelo una infección directa con una “*multiplicity of infection*” (MOI) de 10, es decir, 10 bacterias por cada linfocito T CD4⁺. Se contaron las colonias bacterianas que aparecieron en las placas de Petri y normalizaron los datos por el número de células lisadas. Los linfocitos T CD4⁺ no son susceptibles a la infección directa por ninguna de las bacterias usadas, pero sorprendentemente, al ponerlos en contacto con las DC se produce un paso de bacterias desde las DC a los linfocitos T, lo cual nunca antes había sido descrito. Este paso de bacterias o transinfección

Figura 4.4

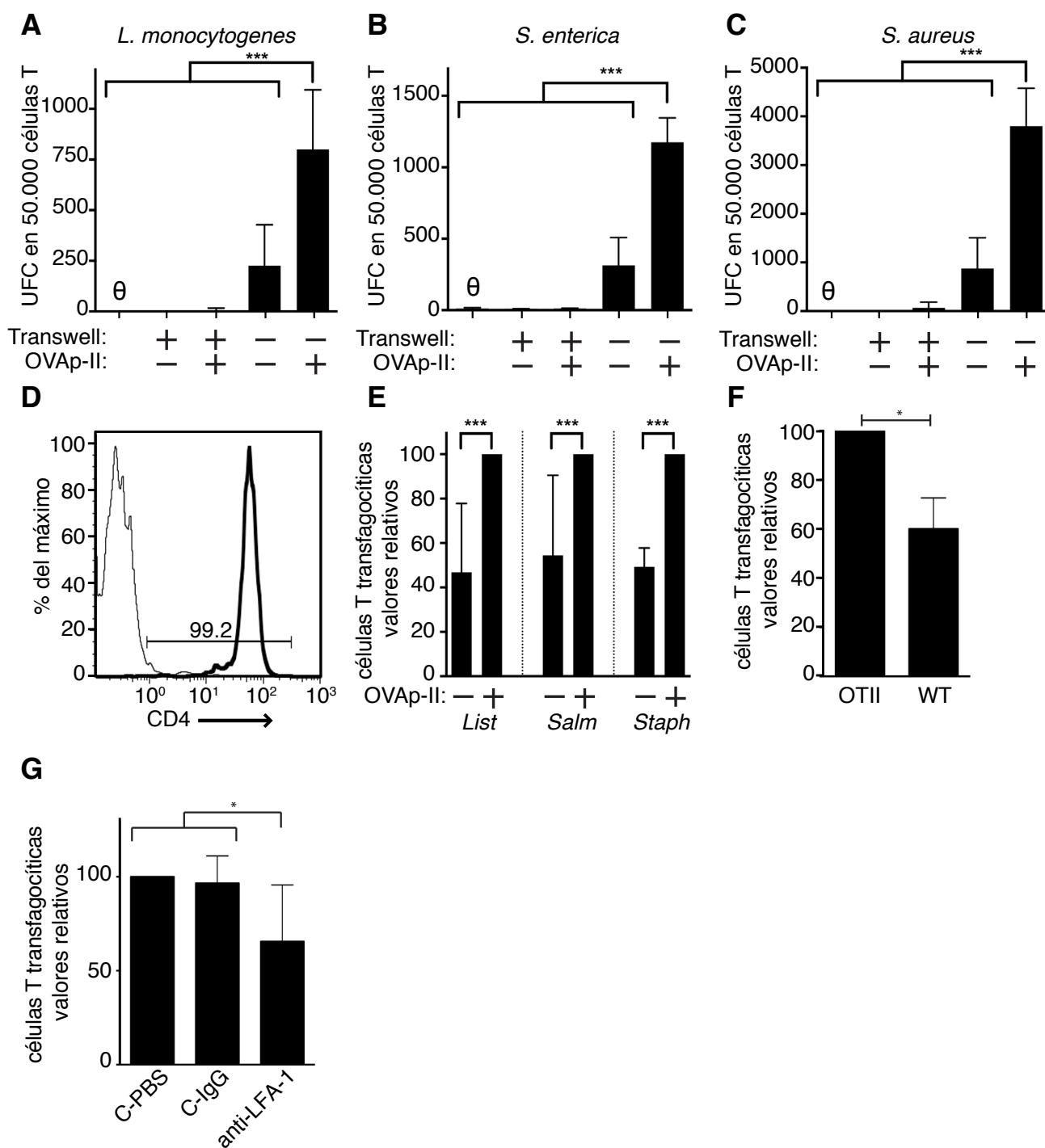


Figura 4.4. Cuantificación de la captura bacteriana por linfocitos T CD4⁺ de ratón. (A-C) Ensayos de supervivencia a gentamicina tras 1 hora de contacto entre DCs infectadas con las bacterias indicadas y linfocitos T CD4⁺. Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs; bacterias vivas intracelulares) por cada 50.000 linfocitos T CD4⁺ (aislados de ratones OT-II). Se permite el contacto entre ambos tipos celulares, o se impide mediante el uso de una barrera física (TW). Se compara a su vez la importancia de la presentación antigénica cuando las DCs estaban decoradas con pOVA-II. La infección directa (MOI=10) de los linfocitos se indica en θ . **(D)** Pureza, analizada por citometría de flujo, de los linfocitos T CD4⁺ aislados tras el contacto con las DCs infectadas. La línea gruesa muestra el porcentaje de células positivas para CD4 y la línea fina muestra el control negativo de anticuerpos. Se muestra un experimento típico. **(E)** Captura de bacterias por parte de linfocitos T CD4⁺, cuantificado esta vez por citometría de flujo. Se comparan DCs decoradas o no con OVAp-II. Identificamos las bacterias extracelulares usando un anticuerpo fluorescente antes de la fijación/permeabilización. **(F)** Cuantificación mediante citometría de flujo de la captura bacteriana (*Salmonella*-GFP) por parte de linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II, o WT desde DCs decoradas con pOVA-II. **(G)** Cuantificación mediante citometría de flujo de la captura bacteriana (*Salmonella*-GFP) por parte de linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II desde DCs decoradas con pOVA-II, en presencia de un anticuerpo anti LFA-1, un anticuerpo control de su mismo isotipo (C-IgG), o PBS.

se ve significativamente aumentada si hay existe reconocimiento antigénico (Figura 4.4 A-C). Concretamente podemos ver que el paso bacteriano sin reconocimiento antigénico se presenta en el 1-2% de los linfocitos convencionales, mientras que cuando se produce reconocimiento antigénico sube alrededor del 2-8%, dependiendo de la bacteria. En todos los experimentos, se comprobó por citometría de flujo la pureza de los linfocitos tras la selección negativa, como se puede ver en la Figura 4.4 D. Solo se analizaron los resultados con una pureza superior al 95%, y en paralelo siempre se cuantifican las bacterias intracelulares de las DC, por lo que en caso de contaminación de DC, se sustraen de los resultados de las UFC correspondientes.

Estos resultados se corroboraron por citometría de flujo usando bacterias fluorescentes (Figura 4.4 E). Como se muestra, la población de linfocitos T CD4⁺ que capturan bacterias aumentó durante el reconocimiento antigénico.

Para confirmar si el reconocimiento antigénico juega un papel en la transinfección, se pusieron en contacto DC infectadas con *Salmonella*-GFP y decoradas con péptido OVAp-II, con linfocitos T CD4⁺ aislados de ratones WT o de ratones OT-II. Tras 30 minutos de contactos se prepararon las muestras para su análisis por citometría de flujo (Figura 4.4 F). Las células aisladas de ratones OT-II (que reconocen el

Figura 4.5

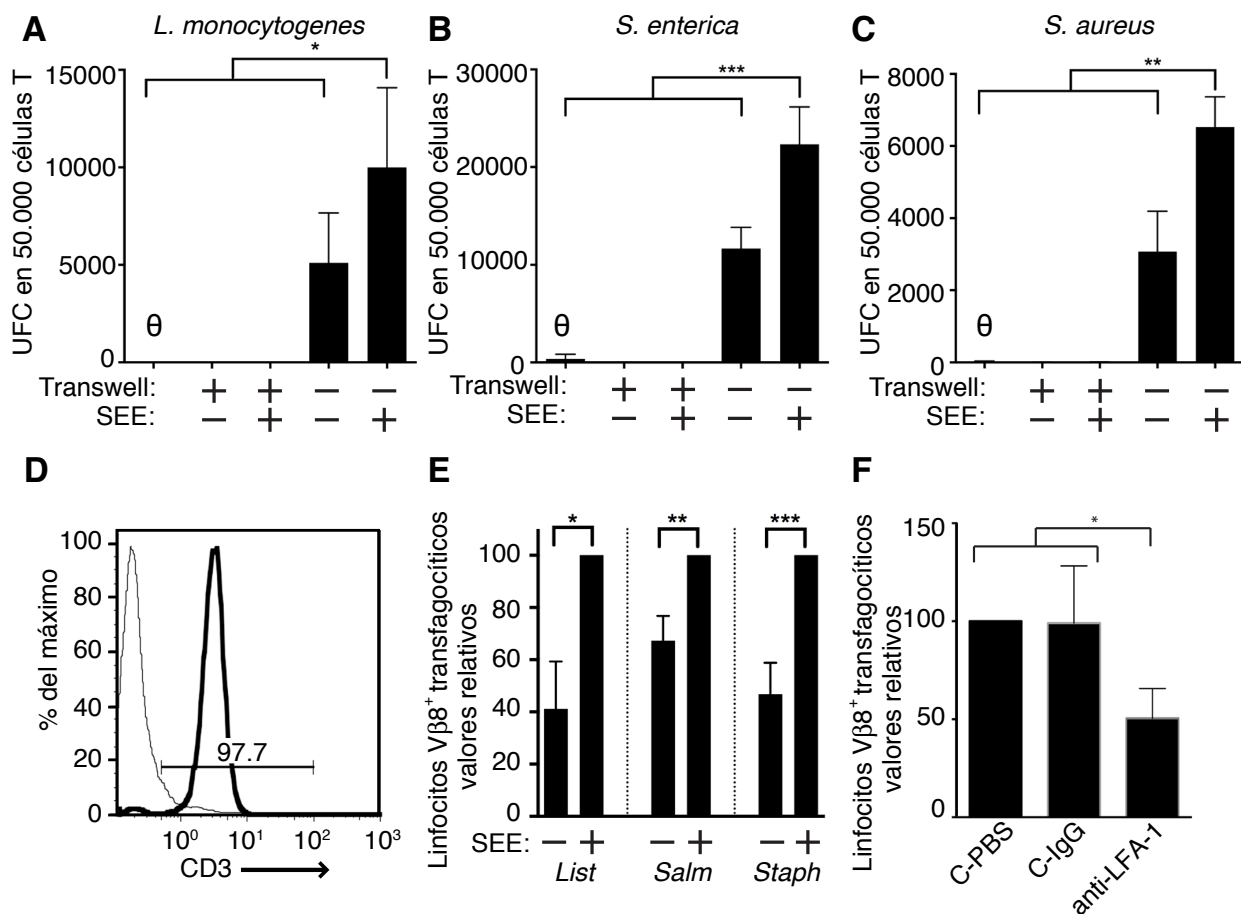


Figura 4.5. Cuantificación de la captura bacteriana por linfoblastos humanos. (A-C) Ensayos de supervivencia a gentamicina tras 1 hora de contacto entre DC infectadas con las bacterias indicadas y linfocitos T CD4⁺ enriquecidos en V β 8 y otros TCR que reconocen SEE. Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC; bacterias vivas intracelulares) por cada 50.000 linfocitos T. Se permite el contacto entre ambos tipos celulares, o se impide mediante el uso de una barrera física (TW). Se compara a su vez la importancia de la presentación antigénica cuando las DC estaban decoradas con SEE. La infección directa (MOI=10) de los linfocitos se indica en θ . (D) Pureza, analizada por citometría de flujo, de los linfocitos T aislados tras el contacto con las DC infectadas. La línea gruesa muestra el porcentaje de células positivas para CD3 y la línea fina muestra el control negativo de anticuerpos. Se muestra un experimento típico. (E) Captura de bacterias por parte de linfocitos T CD4⁺, cuantificado esta vez por citometría de flujo. Se comparan DC decoradas o no con SEE. (F) Cuantificación mediante citometría de flujo de la captura bacteriana (*Salmonella*-GFP) por parte de linfocitos T desde DC decoradas con SEE, en presencia de un anticuerpo anti LFA-1, un anticuerpo control de su mismo isotipo (C-IgG), o PBS (C-PBS).

antígeno) son capaces de capturar casi el doble de bacterias que las que no forman IS.

Para confirmar el papel de la formación de la IS en la captura de las bacterias, usamos un anticuerpo

contra LFA-1, una proteína que juega un papel crucial en la estabilización de la IS entre APC y linfocito T. Su bloqueo mediante anticuerpos inhibe parcialmente la formación de la IS (Sánchez-Madrid et al., 1983). Al bloquear parcialmente la formación de IS, la captura de las bacterias disminuye de forma significativa (Figura 4.4 G). Este experimento confirmó que la formación de IS potencia la captura de bacterias por parte de los linfocitos T CD4⁺.

Se repitieron estos experimentos de supervivencia a gentamicina cuantificando la entrada bacteriana en el sistema de células humanas (Figura 4.5 A-C). Los resultados corroboraron que los linfocitos T CD4⁺ humanos también capturan bacterias desde las DC infectadas, para ello requieren un contacto célula-célula, y la transinfección aumenta durante el reconocimiento antigénico. En todos los experimentos se realizaron controles por citometría de flujo de la pureza de los linfocitos re-aislados tras el contacto con las DC (Figura 4.5 D). Al igual que hicimos con células de ratón, en el modelo de células humanas, para confirmar los resultados, analizamos los experimentos de transinfección, usando bacterias fluorescentes (*Salmonella*-GFP, *Listeria*-GFP y *Staphylococcus*-GFP), por citometría de flujo (Figura 4.5 E), así como los experimentos bloqueando LFA-1 (Figura 4.5 F). Los resultados confirmaron que la transinfección requiere de contacto célula-célula, y aumenta con el reconocimiento antigénico durante la formación de la IS.

En resumen, confirmamos que los linfocitos T CD4⁺ capturan bacterias desde DC previamente infectadas y esta captura de bacterias se potencia por el reconocimiento antigénico (Figura 4.5 E-F). Los porcentajes de los linfocitos T CD4⁺ de ratón que capturan bacterias por esta vía a tiempos cortos están en el rango del 2-8%, aumentando en el sistema de células humanas al 14-40%. Nótese que a partir de ahora denominaremos a este tipo de captura bacteriana, transfagocitosis en vez de transinfección, porque, como veremos más adelante en esta tesis, es un mecanismo dirigido por los linfocitos, donde las bacterias juegan un papel pasivo. No se trata de una infección activa.

Figura 4.6

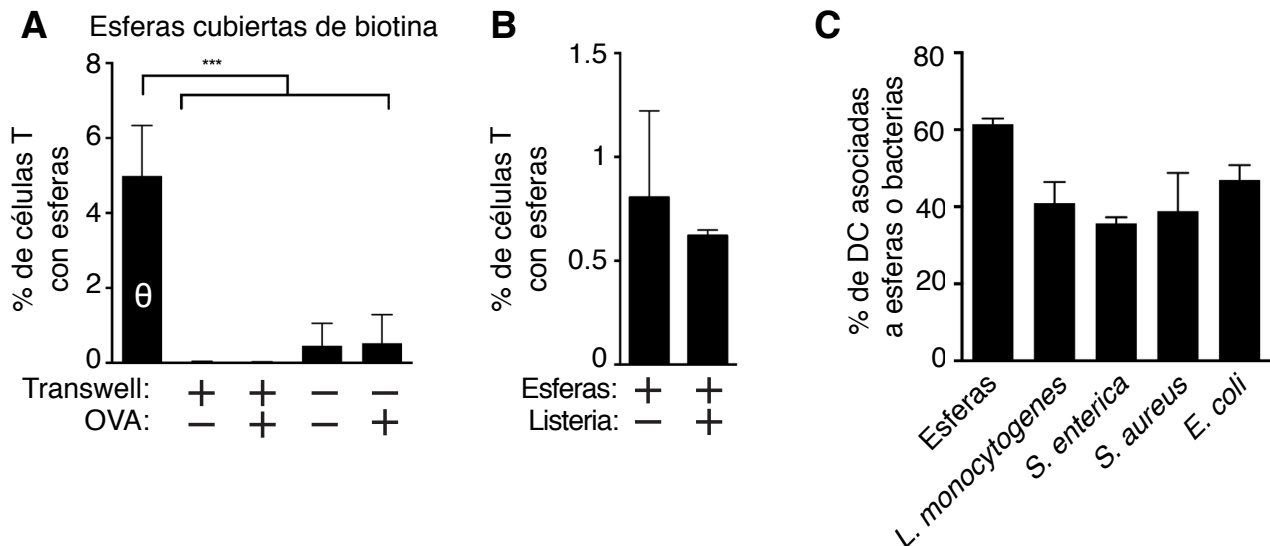


Figura 4.6. La transfagocitosis es específica. (A) Cuantificación de la captura de micro-esferas fluorescentes decoradas con biotina por linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II mediante citometría de flujo. Identificamos las micro-esferas asociadas a los linfocitos pero extracelulares mediante el uso de estreptavidina fluorescente (con un fluoróforo diferente que el de las micro-esferas). La captura de las micro-esferas de forma directa está indicada con θ. En el resto de condiciones las micro-esferas son capturadas primero por DC (decoradas o no con OVAp-II) y luego estas se ponen en contacto con linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II en presencia o no de una barrera física, un filtro de polycarbonato con poro de 3 μm de diámetro (TW), que impide el contacto entre los dos tipos celulares. **(B)** Cuantificación de transfagocitosis de micro-esferas en presencia o no de *L. monocytogenes*. **(C)** Cuantificación de la captura de las bacterias fluorescentes usadas anteriormente y las micro-esferas por parte de DC (MOI 1:10). La ratio de bacterias o beads con las DC fue de 10:1.

4.4 La transfagocitosis es específica para bacterias

Para determinar si la transfagocitosis es un mecanismo específico de las bacterias, diseñamos una aproximación experimental que enfrentase la transfagocitosis de micro-esferas de látex fluorescentes de tamaño aproximadamente similar a una bacteria (1 μm) frente a las bacterias (Figura 4.6 A). Los resultados indican que, aunque los linfocitos T CD4⁺ son capaces de fagocitar micro-esferas de forma directa, tienen muy disminuida su capacidad para capturar estas esferas desde las células DC. Para probar si la infección con bacterias podía potenciar el paso de las micro-esferas, se infectaron DC con *Listeria* y micro-esferas a la vez. La infección no potencia la captura de las micro-esferas (Figura 4.6 B). Como

control se midió la capacidad de las DC para fagocitar micro-esferas. La fagocitosis de bacterias y micro-esferas por las DC no presenta diferencias, lo que descarta que la disminución de la transfagocitosis se debiese a una baja adquisición de micro-esferas por parte de las DC (Figura 4.6 C).

Los resultados obtenidos indican que la captura de bacterias vía transfagocitosis es un mecanismo específico para capturar bacterias y no otros cuerpos inertes.

4.5 La transfagocitosis por parte de los linfocitos es dependiente de la actividad del citoesqueleto

Las imágenes y los vídeos de microscopía confocal muestran cambios rápidos de morfología y movimientos celulares, lo que sugiere la posibilidad de que el citoesqueleto de los linfocitos T podría estar jugando un papel clave en el proceso de transfagocitosis, tal y como lo hace en las IS (Benvenuti, 2016; Calabia-Linares et al., 2011). Para probar esta hipótesis decidimos analizar la transfagocitosis cuando se inhibe químicamente la dinámica del citoesqueleto, usando Citocalasina D (Ornelles et al., 1986) o Colchicina (Kharitonenko et al., 2015). La Colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos gracias a su unión a la tubulina, mientras que la Citocalasina D impide la polimerización de los filamentos de actina mediante la unión a los mismos. Realizamos unos ensayos de supervivencia a gentamicina, como los realizados anteriormente, pero añadiendo Citocalasina D o Colchicina a los linfocitos T CD4⁺ antes de incubarlos con las DC infectadas. Este experimento se realizó tanto en el sistema de ratón (Figura 4.7 A) como en el de células humanas (Figura 4.7 B). En ambos sistemas los datos coinciden, la inhibición química del citoesqueleto provoca un descenso en el número de bacterias captadas por los linfocitos T CD4⁺, indicando que el citoesqueleto de actina y los microtúbulos tienen un papel clave en el mecanismo de la transfagocitosis.

Figura 4.7

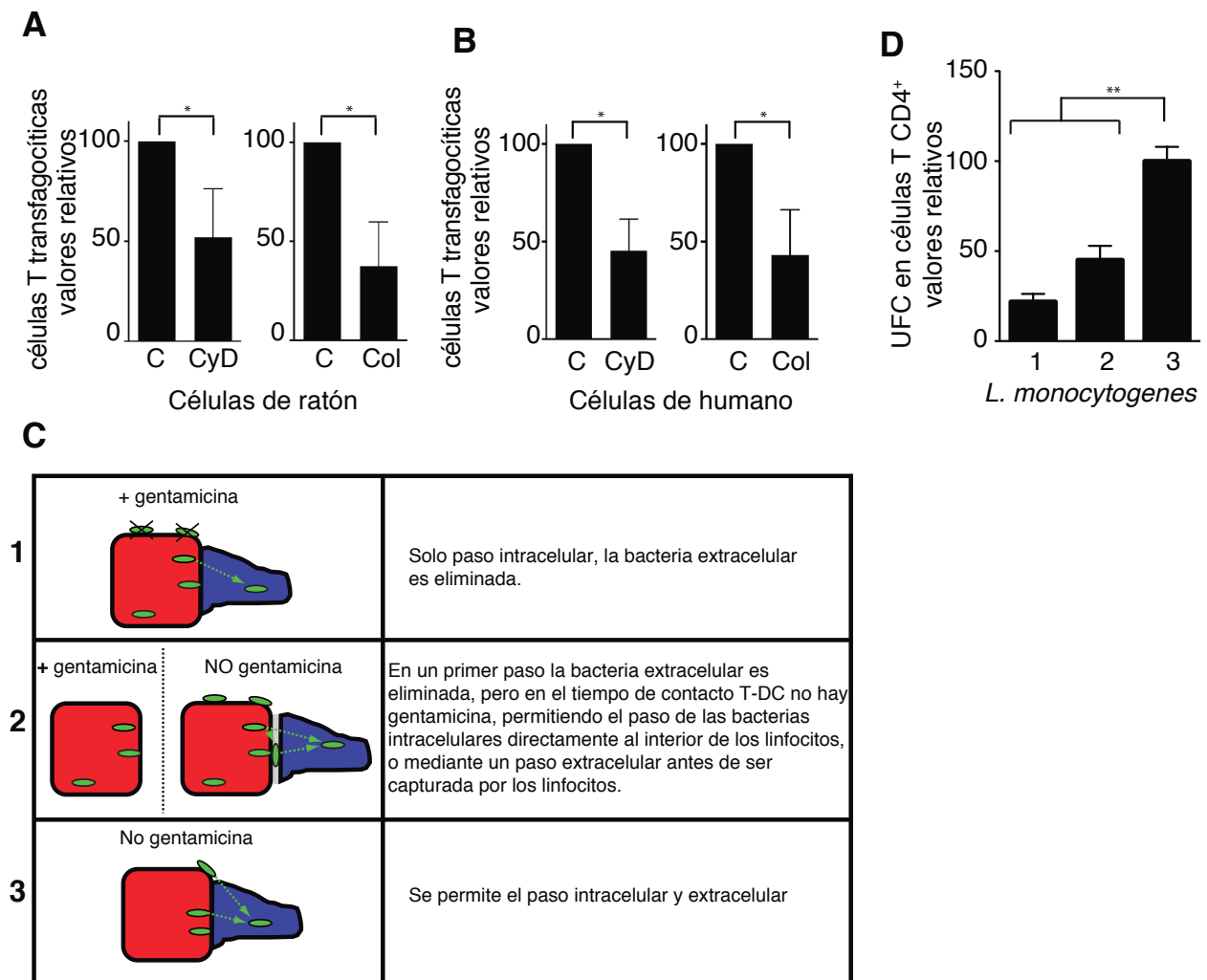


Figura 4.7. El citoesqueleto de los linfocitos T juega un papel central en la transfangocitosis. (A y B) Cuantificación de la transfangocitosis por citometría de flujo en linfocitos T CD4⁺ de ratón, A, o humanos, B, tratados con colchicina (Col) o citocalasina D (CyD). Los resultados se muestran respecto al control, sin tratar (sólo con el solvente DMSO; C). **(C)** Descripción de condiciones experimentales; 1, proceso de transfangocitosis en presencia de gentamicina (solo se permite el paso intracelular). 2, tras la captura de las bacterias por parte de las DC, se añade gentamicina. Antes de la formación de los conjugados con los linfocitos T CD4⁺, se lavan las DC infectadas para eliminar el antibiótico, así la transfangocitosis se da en ausencia de gentamicina (Las bacterias intracelulares de las DC pueden pasar a los linfocitos por una vía exclusivamente intracelular, o salir de las DC y entrar en los linfocitos desde el exterior). 3, No se añade gentamicina en ningún paso. Todas las bacterias asociadas a las DC (intracelulares o extracelulares) pueden ser captadas por los linfocitos. **(D)** Entrada bacteriana cuantificado en experimentos de supervivencia a gentamicina en las condiciones descritas en **(C)**.

Figura 4.8

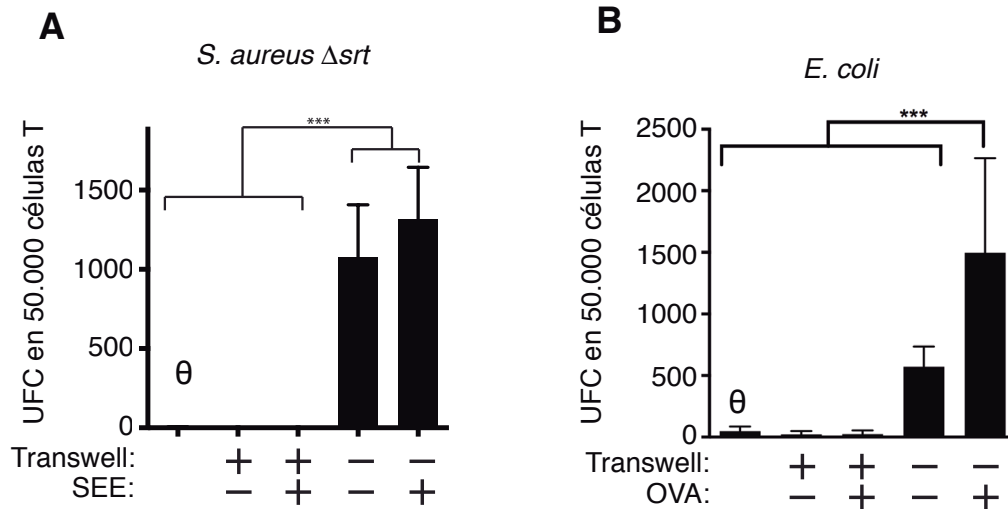


Figura 4.8. Bacterias no patógenas también pueden ser transfangocitadas. Ensayos de supervivencia a gentamicina tras 1 hora de contacto entre DC infectadas con bacterias no patógenas (*S. Aureus Δsrt*; A, o *E. coli* DH5α, B) y linfocitos T CD4⁺. Se muestran las UFC por cada 50.000 linfocitos T CD4⁺ (aislados de ratones OT-II). Se permite el contacto entre ambos tipos celulares, o se impide mediante el uso de una barrera física (TW). Se compara a su vez la importancia de la presentación antigénica cuando las DC estaban decoradas con OVAp-II. La infección directa (MOI=10) de los linfocitos se indica en θ.

4.6 Las bacterias transfangocitadas por los linfocitos T CD4⁺ provienen tanto del interior de las DC como de la superficie de las mismas

Una cuestión que aún quedaba abierta era la concerniente a la procedencia de las bacterias que posteriormente veíamos en el interior de los linfocitos T CD4⁺, es decir, las bacterias podían proceder del interior de las DC, aunque también podrían proceder de las bacterias extracelulares asociadas a las DC. Para discernir entre las posibles vías de entrada, diseñamos un experimento de supervivencia a gentamicina similar a los explicados anteriormente, pero con tres condiciones diferentes; en presencia de gentamicina durante la formación de los conjugados (condición 1), sólo se permite la translocación de bacterias intracelulares. Cuando la gentamicina se lava antes de la conjugación (contacto DC-T), las bacterias intracelulares que infectan las DC pueden translocarse a las células T directamente desde el interior de las DC, o mediante un paso extracelular antes de ser capturadas por las células T (condición 2). En ausencia de gentamicina (condición 3), las bacterias capturadas pueden ser intracelulares, o extrace-

lulares asociadas a las DC. Los resultados indican que aproximadamente el 50% de las bacterias se capturan del exterior de las DC, y respecto al otro 50% de bacterias que se capturan desde el interior de las DC, aproximadamente un 25% se capturan vía exclusivamente intracelular (pasan del interior de las DC al interior de los linfocitos) mientras que el otro 25% experimenta un paso extracelular, posiblemente al espacio sináptico, antes de ser transfangocitada por el linfocito T CD4⁺ (Figura 4.7 C). Para una explicación gráfica del experimento, ver Figura 4.7 D.

4.7 La patogenicidad de las bacterias no influye sobre la transfangocitosis

Para determinar si las bacterias juegan un papel activo en el proceso de transfangocitosis, comparamos la captura de bacterias patógenas con bacterias no invasivas, *Escherichia coli* K12 (DH-5 α) y atenuadas, *Staphylococcus aureus* Δ srt, cuya sortasa está deleccionada, impidiendo que numerosas proteínas relacionadas con su virulencia puedan anclarse en su pared celular (Mazmanian et al., 1999). La sortasa es la principal proteína responsable de anclar a la pared celular de diversos organismos Gram positivos proteínas con el motivo LPXTG (Leu-Pro-any-Thr-Gly). Muchas de estas proteínas son factores de virulencia. Así, el mutante *S. aureus* Δ srt no es virulento (Mazmanian et al., 1999; 2000). Los resultados muestran que las cepas no patógenas también son transfangocitadas indicando que la transfangocitosis no necesita de factores de virulencia bacterianos. Estos resultados sumados a la participación del citoesqueleto de los linfocitos T CD4⁺ en la misma indican que la transfangocitosis es un mecanismo orquestado por los linfocitos T CD4⁺, y no de forma directa por las bacterias (Figura 4.8 A-B). Hicimos ensayos de transfangocitosis usando *Salmonella-GFP* muerta por calor, pero las DC capturaban muchas menos bacterias muertas que vivas, lo que impedía comparar correctamente la transfangocitosis de unas y otras (no se muestra).

Figura 4.9

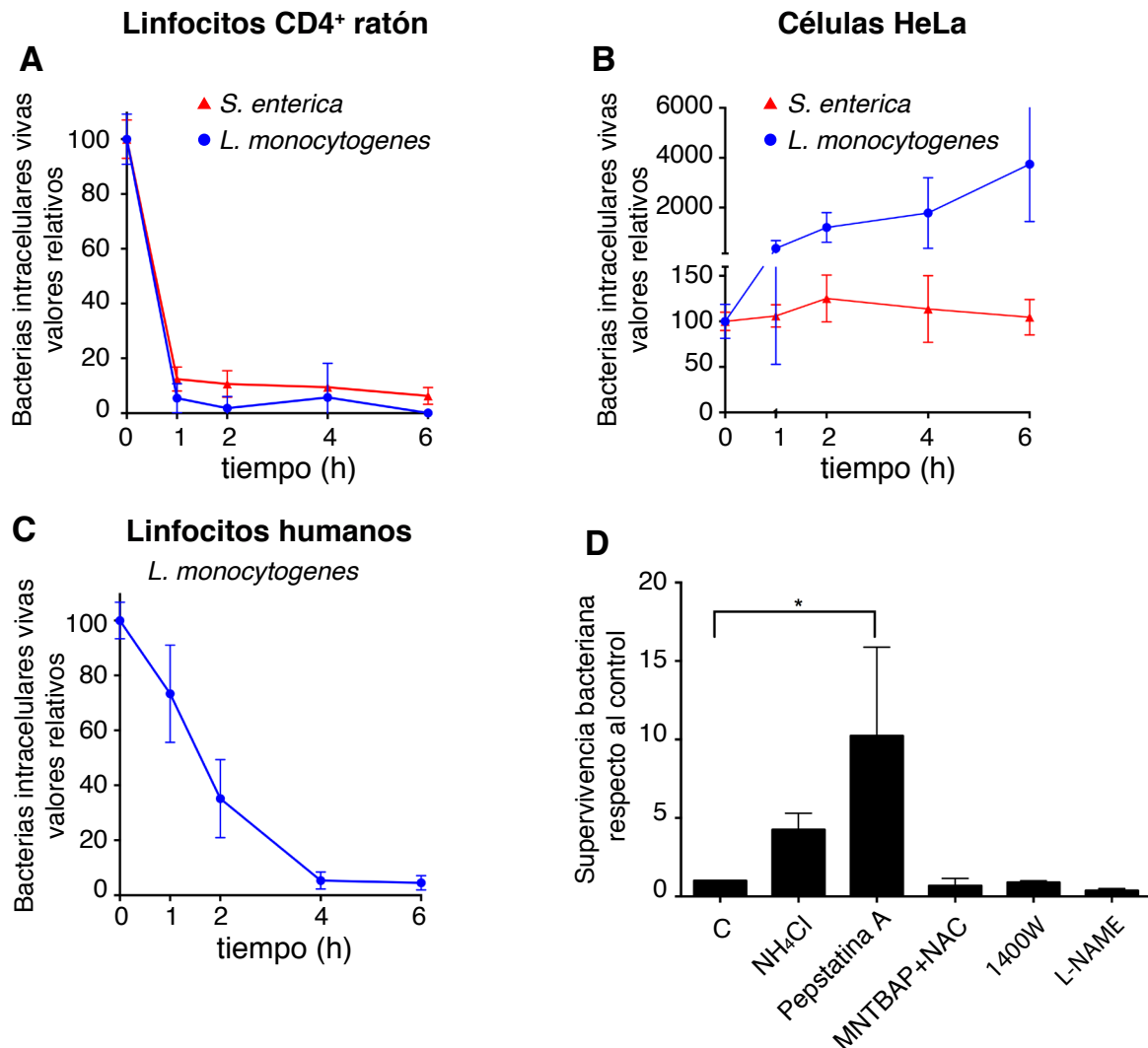


Figura 4.9. Los linfocitos transfagocíticos destruyen las bacterias que capturan. (A) Ensayo de supervivencia a gentamicina de las bacterias indicadas capturadas por transfagocitosis por linfocitos T CD4⁺ de ratón OT-II analizado a diferentes tiempos tras la captura. La supervivencia de las bacterias se indica respecto al primer tiempo analizado. (B) Control del “fitness” bacteriano. Las bacterias indicadas infectan células HeLa y se sigue su supervivencia exactamente como en A. (C) Análisis de supervivencia bacteriana en el modelo de células humanas; se llevó a cabo exactamente como en A. (D) Cuantificación de la supervivencia intracelular de bacterias (*L. monocytogenes*) capturadas por linfocitos T CD4⁺ de ratón analizada a las 6 horas de su captura (ensayo de supervivencia a gentamicina), en presencia de inhibidores de diferentes rutas degradativas (NH₄Cl, inhibidor de la fusión fagosoma-lisosoma; pepstatina A, inhibidor de las proteasas ácidas de los lisosomas; MnTBAP, inhibidor del estrés oxidativo; NAC, inhibidor de las especies reactivas de oxígeno; 1400w y L-NAME, inhibidores de la degradación por óxido nítrico). Los datos se muestran normalizados respecto al control sin inhibidores.

4.8 Los linfocitos T transfagocíticos son capaces de degradar las bacterias que capturan

Para determinar el destino de las bacterias transfagocitadas se realizó un ensayo de supervivencia a gentamicina plaqueando a diferentes tiempos los lisados de linfocitos T CD4⁺ transfagocíticos en placas de BHI-Agar. El tiempo 0h se tomó como referencia del 100% de bacterias transfagocitadas (Figura 4.9 A). Los resultados del ensayo indican que los linfocitos T CD4⁺ eliminan de forma rápida y eficaz las bacterias que capturan. Como control del “fitness” bacteriano, realizamos una infección paralela en células HeLa donde se observa una rápida multiplicación de las bacterias (Figura 4.9 B), confirmando que la degradación que observamos en los linfocitos T es debida a un mecanismo activo de eliminación de las bacterias. El experimento se repitió con el sistema de células humanas (Figura 4.9 C). En este sistema se reproduce la misma degradación bacteriana dentro de los linfocitos T CD4⁺.

Estos resultados sorprendentes muestran que los linfocitos T CD4⁺ no solo son capaces de capturar bacterias, sino que son capaces de eliminarlas de manera muy eficaz. Esto es sorprendente porque estas características (captura y eliminación bacteriana) son propios de células del sistema inmune innato, y los linfocitos T CD4⁺ convencionales, los usados en este estudio, son el paradigma de células del sistema inmune adaptativo.

Con el objetivo de describir la vía de degradación bacteriana usada por los linfocitos T CD4⁺ analizamos esta degradación usando agentes químicos que inhiben diferentes vías de degradación; NH₄Cl (inhibidor de la fusión del fagosoma con el lisosoma)(Hart and Young, 1991), pepstatina A (inhibidor de las aspartil proteasas, también conocidas como proteasas ácidas, que se encuentran en los lisosomas) (Gross et al., 1972), MnTBAP (compuesto que mimetiza la Super Óxido Dismutasa (SOD) produciendo menos estrés oxidativo)(Choi et al., 1999), NAC (inhibidor de la producción de especies reactivas de oxígeno) (Palareti et al., 2015), 1400w y L-NAME (inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa) (Garvey et al., 1997; Thiernemann et al., 1993). Los resultados muestran que la pepstatina A y el NH₄Cl, ambos inhibidores de la vía lisosomal, pero no las otras drogas, inhiben parcialmente la degradación bacteriana

Figura 4.10

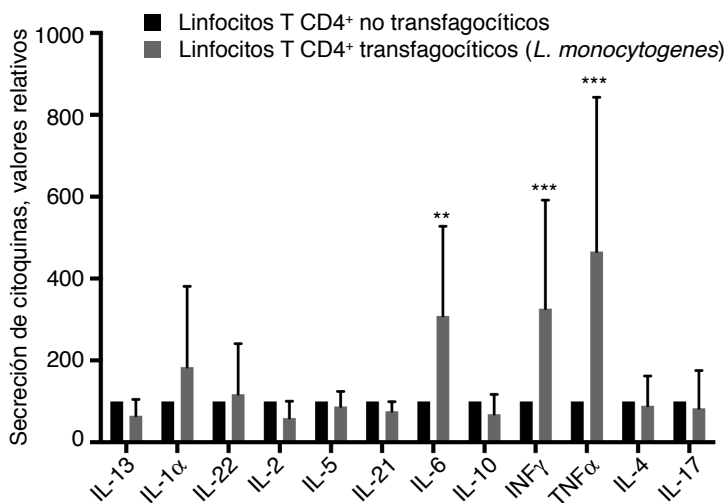


Figura 4.10. Los linfocitos T CD4⁺tf son pro-inflamatorios. Análisis del patrón de secreción de diferentes citoquinas de linfocitos T CD4⁺tf, o activados mediante contacto con DCs no infectadas. Se analiza por “cytometric bead array: CBA” y se muestra la secreción de cada citoquina de los linfocitos T CD4⁺tf (gris) respecto a la observada en linfocitos activados pero no transfagocíticos (negro). Se muestra la media de tres ensayos independientes, la barra de error representa la desviación estándar (sd).

(Figura 4.9 D). Lo que indica que la degradación bacteriana ocurre por vía lisosomal.

4.9 Los linfocitos T CD4⁺ transfagocíticos son pro-inflamatorios

Con el objetivo de caracterizar los cambios fenotípicos que ocurren en los linfocitos T CD4⁺ trans-fagocíticos (tf), tras capturar las bacterias, decidimos analizar su patrón de secreción de citoquinas. Los conjugados se forman entre linfocitos T CD4⁺ de ratón y DC cargadas con el péptido de pOVA-II pero no infectadas, o DC cargadas con el péptido de pOVA-II e infectadas con *L. monocytogenes*. Los linfocitos T CD4⁺ se aislaron por selección negativa después de formar los conjugados con las DC y se estimularon con anticuerpos anti CD3 y CD28, durante 72 horas. 6 horas antes de la medición de citoquinas se estimularon con PMA (éster de forbol-12-miristato-13-acetato) para mejorar detección de las citoquinas contenidas en los linfocitos (OMahony et al., 1998). Los niveles de citoquinas se detectaron por “cytometric bead array, CBA”. El ensayo de CBA se basa en la unión de micro-esferas fluorescentes recubiertas de anticuerpos contra una citoquina concreta, lo cual permite medir niveles relativos de varias citoquinas a la vez en poblaciones celulares por citometría de flujo. Los resultados revelan un aumento significativo de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6, interferón γ (IFN- γ) y factor

Figura 4.11

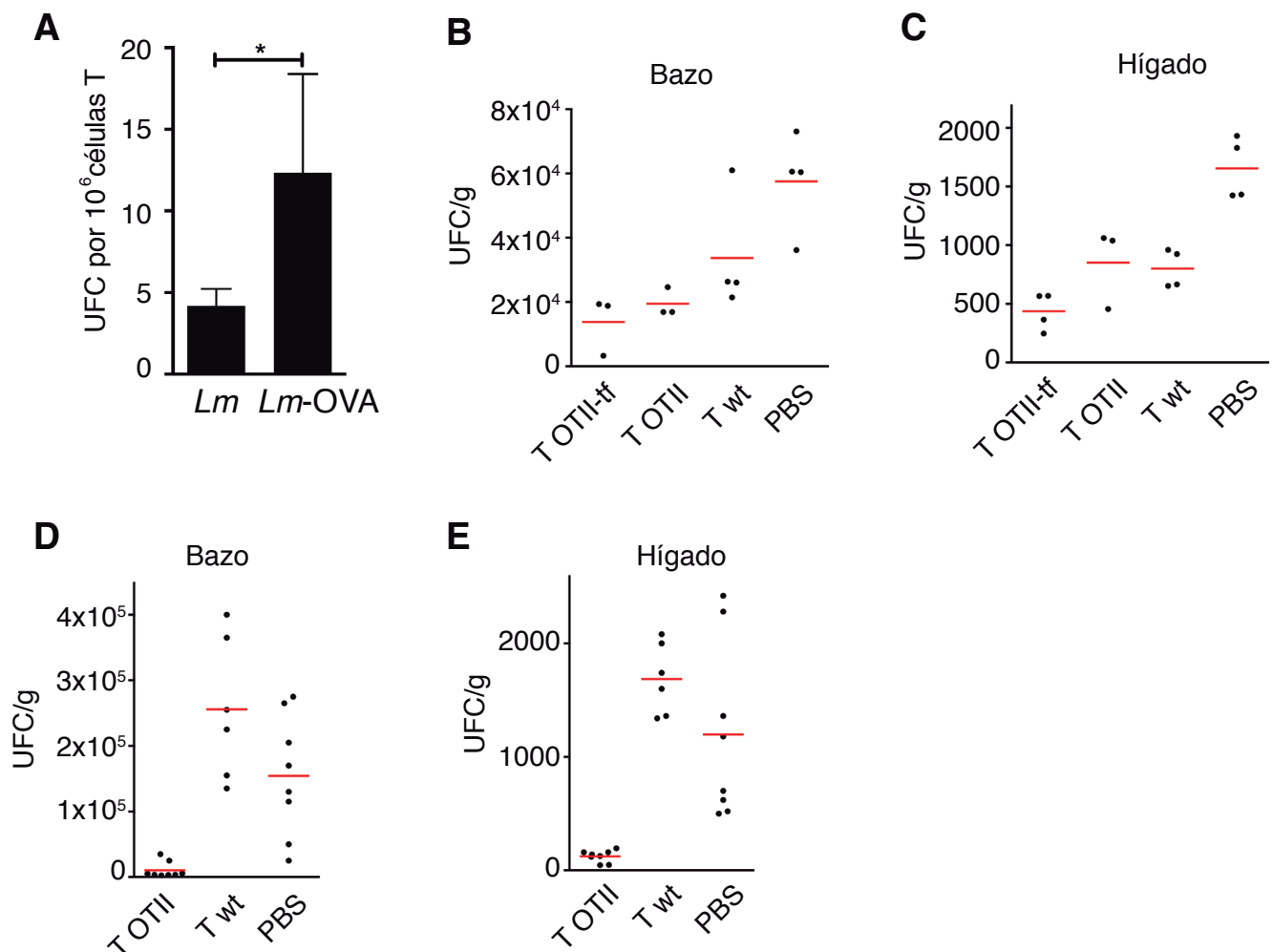


Figura 4.11. Los linfocitos transfagocíticos confieren protección contra infecciones in vivo. (A) Cuantificación de la transfagocitosis in vivo. Se infectaron ratones OT-II con aproximadamente 50000 *Listeria* WT o *Listeria*-OVA vía intravenosa (i.v.). Tras 24 horas se purificaron los linfocitos T CD4⁺ del bazo en presencia de gentamicina y se plaquearon los lisados celulares en medio BHI agar para contar las colonias (UFC). Se muestran los resultados de tres experimentos independientes. La barra de error muestra la SD. * p<0.05 analizado por T Student. (B, C) Cuantificación de carga bacteriana en bazo (B) e hígado (C). A ratones WT se les inyectaron (i.v.): linfocitos T CD4⁺ de ratón WT, linfocitos T CD4⁺ de ratón OT II y linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA de ratón OT II. 24 horas más tarde se infectaron con *Listeria*-OVA (i.v.) a dosis subletal (30000 bacterias/ratón). Tras 24 horas de infección, los ratones se sacrificaron, y se analizó la carga bacteriana sembrando en placas de BHI agar extractos de hígado y bazo. (D, E) Cuantificación de carga bacteriana en bazo (D) e hígado (E) 48 horas tras la infección, analizado de la misma forma que los experimentos mostrados en (B, C), pero sin la condición de linfocitos CD4⁺ transfagocíticos. En (B-E) cada punto representa el análisis de un ratón, la línea roja indica la media.

de necrosis tumoral α (TNF- α) en los linfocitos T CD4⁺tf, similar al patrón de secreción de citoquinas observadas durante las respuestas Th1 (Figura 4.10). Nótese que la resolución de las infecciones de

L. monocytogenes depende de la respuesta Th1 (Buchmeier and Schreiber, 1985; Slifman et al., 2003).

4.10 Los linfocitos T CD4⁺tf confieren protección frente a *Listeria* *in vivo*

Con estas premisas, nos propusimos a analizar si el patrón de citoquinas pro-inflamatorias que secretan los linfocitos T CD4⁺tf confiere protección *in vivo* en el transcurso de una infección bacteriana.

En una primera aproximación se inyectaron por vía intravenosa (iv) *L. monocytogenes* (en adelante denominaremos *Listeria* WT) o su isogénica que expresa ovoalbúmina (*Listeria*-OVA) (Brockstedt et al., 2004) en ratones transgénicos OT-II. Tras 24 horas de infección los ratones fueron sacrificados, se purificaron los linfocitos T CD4⁺ de ganglios y bazos por selección negativa y se llevó a cabo a un ensayo de supervivencia a gentamicina. Los resultados muestran un aumento del número de bacterias transfangocitadas cuando se produce reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T CD4⁺, lo cual corrobora los resultados obtenidos *in vitro*, demostrando que la transfangocitosis ocurre también *in vivo* (Figura 4.11 A).

Tras estos resultados, tratamos de analizar si la captura de bacterias junto con la potente respuesta pro-inflamatoria observada en los linfocitos T CD4⁺tf podría afectar a la resolución de una infección *in vivo*. Para ello diseñamos un experimento de transferencia adoptiva en ratones receptores WT. Estos ratones se dividieron en 4 grupos experimentales 1, sin células añadidas (PBS, condición control), 2, se transfieren linfocitos T CD4⁺ de ratón WT (T wt), 3, linfocitos T CD4⁺ de ratón OT II (T OTII), y 4, linfocitos T CD4⁺ de ratón OT II que han transfangocitado *Listeria*-OVA *in vitro* antes de la transferencia adoptiva (T OTII-tf). 24 horas tras la inyección (i.v) de las células (tiempo suficiente para que éstas lleguen a sus órganos residentes, ganglio y bazo) se infectaron los animales (i.v) con *Listeria*-OVA (30.000 bacterias por ratón, dosis sub-letal). Tras 24 horas de infección se sacrificaron los ratones, y se analizó la carga bacteriana en bazos e hígado (órganos diana de la infección por *L. monocytogenes*). Los resultados muestran que los linfocitos T CD4⁺tf protegen contra la infección de forma más eficaz (Figura 4.11 B-C). Para

Figura 4.12

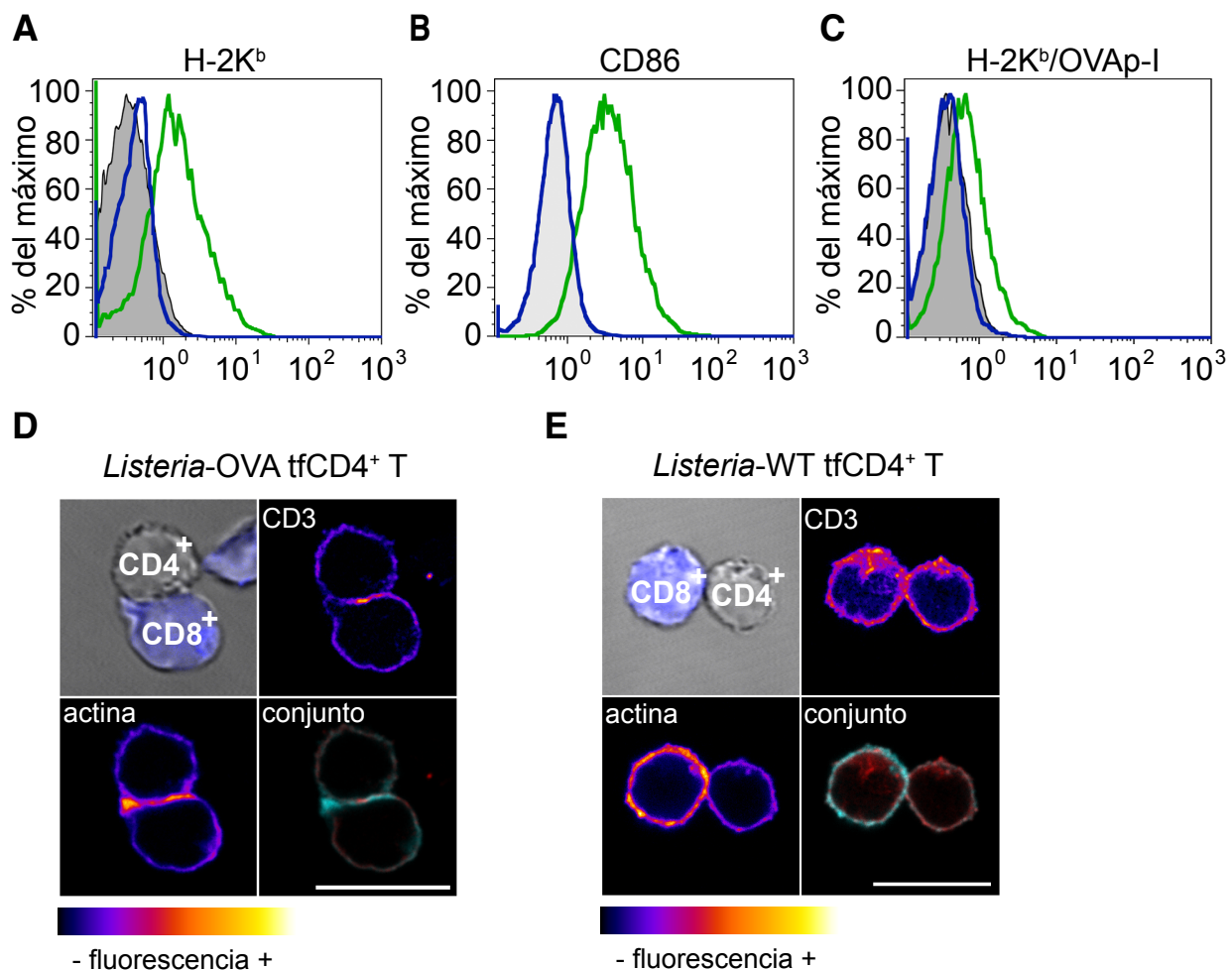


Figura 4.12. Los linfocitos T CD4⁺tf presentan antígenos de las bacterias que capturan. (A-B) Histogramas de intensidad de fluorescencia representando la expresión en superficie de H2-K^b (A) y CD86 (B) medidos por citometría de flujo. En gris se muestra el control negativo (muestra sin marcar), en verde linfocitos CD4⁺tf *Listeria*-OVA (se analizan un día tras la transfectación) y en azul linfocitos T CD4⁺ antes de la transfectación. (C) Histograma de intensidad de fluorescencia representando la expresión del antígeno OVAp-I asociado a H2-K^b en la superficie de linfocitos CD4⁺tf *Listeria*-OVA. En gris se muestra control negativo (linfocitos CD4⁺ sin transfectar), en azul la expresión del complejo H2-K^b/OVAp-I a 24 horas y en verde a 48 horas tras la captura de la bacteria. (D, E) Análisis mediante microscopía confocal de los contactos entre linfocitos T CD4⁺tf (no marcados) y linfocitos T CD8⁺ (aislados de ratones OT-I; marcados con CellTrace Violet, en azul). Las células presentadoras fueron linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA (D) o linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT (E). CD3 y actina se muestran en una gama “fuego” de colores cuya interpretación se muestra debajo de la figura. En la figura mezcla, se muestra CD3 (rojo) y actina (cian). Las barras de escala representan en todos los casos 10µm.

ver el efecto de los linfocitos T CD4⁺tf en la evolución de la infección, se repitió el experimento, esta vez sin la condición de linfocitos T CD4⁺ de ratón OT II transfectando *in vitro* (ya que entendemos que en 48h la transfectación pudo darse de forma eficaz *in vivo*, tal y como se muestra en la Figura 4.11 A), y

dejando la infección más tiempo (48h) (Figura 4.11 D-E). Los resultados muestran que la presencia de linfocitos de ratones OT-II (más transfagocíticos) protegen de manera muy eficaz frente a una infección por *Listeria*-OVA, comportándose como células del sistema inmune innato, provocando una respuesta rápida contra una infección bacteriana.

4.11 Las células T CD4⁺tf establecen sinapsis inmunes con células T CD8⁺ vírgenes

Hasta ahora hemos descrito, en contra de la visión clásica de la inmunología, que los linfocitos T CD4⁺ convencionales son capaces de capturar bacterias por transfagocitosis, destruirlas y provocar una respuesta Th1 rápida de forma similar a las células de la inmunidad innata. En este punto nos preguntamos, si los linfocitos T CD4⁺tf serían capaces de presentar antígenos, activando a otros linfocitos. De hecho, dado que la respuesta contra *L. monocytogenes* (nuestra bacteria modelo) es dependiente de los linfocitos T CD8⁺, nos centramos en investigar si los linfocitos T CD4⁺tf pueden presentar antígenos activando a los linfocitos T CD8⁺. Si esto ocurriese así, sería de una enorme relevancia científica, dado que actualmente se cree que sólo algunas poblaciones de DC, y en menor medida algunas de linfocitos B e iNKT, son capaces de activar los linfocitos T CD8⁺, que una vez activados tienen la capacidad de resolver infecciones (de bacterias intracelulares y virus principalmente), así como de eliminar tumores (Yiwen et al., 2016).

Como primera aproximación decidimos testar si los linfocitos T CD4⁺tf que capturaron *Listeria* OVA (linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA) expresan las moléculas necesarias para realizar presentación (cruzada) de antígenos, es decir, MHC-I y moléculas co-estimuladoras como CD86 (Lang et al., 2002). Como se puede observar, (Figura 4.12 A-B), los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA, tienen aumentada la expresión de MHC-I (haplotipo H-2K^b) y CD86, con lo que tendrían las herramientas para poder activar linfocitos T CD8⁺. Es más, estos linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA, son capaces de procesar las bacterias, y presentar antígenos bacterianos (OVA) en MHC-I como se puede observar por citometría de flujo usando un anticuerpo que reconoce un péptido específico de OVA asociado al haplotipo H-2K^b de MHC-I (Figura 4.12 C).

Para que se produzca una activación correcta del sistema inmune adaptativo se deben de producir contactos, con reconocimiento antigénico, entre APC y linfocito que den como resultado la formación de la sinapsis inmune (IS) (Dustin, 2014; Yokosuka and Saito, 2009). La existencia de IS entre linfocitos T CD4⁺tf y linfocitos T CD8⁺ vírgenes se analizó por microscopía confocal. Los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* WT y los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA se purificaron y pusieron en contacto durante 1 hora con los linfocitos T CD8⁺ vírgenes aislados de ratones transgénicos OT-I. Estos ratones poseen linfocitos T CD8⁺ cuyo TCR reconoce un péptido de la ovoalbúmina (OVA 257-264 SIINFEKL, denominado pOVA-I) presentado en el haplotipo H-2K^b de MHC-I. El análisis de los resultados de la microscopía confocal confirma la formación de IS maduras visualizadas por la formación del anillo de actina típico del pSMAC, rodeando una concentración central de TCR (cSMAC) entre linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria*-OVA y T CD8⁺ (Figura 4.12 D y vídeo 6). Las T CD4⁺tf-*Listeria* WT fueron incapaces de formar SI con las T CD8⁺ (Figura 4.12 E), en los pocos contactos (T CD4⁺tf/T CD8⁺) que pudimos encontrar.

Estos resultados son la primera evidencia que indica que los T CD4⁺tf pueden presentar antígenos de las bacterias que capturan y destruyen para activar otros linfocitos.

4.12 Los linfocitos T CD4⁺tf realizan presentación cruzada a los linfocitos T CD8⁺ *in vitro*

Para confirmar si los linfocitos T CD4⁺tf son capaces de actuar como APC, activando linfocitos T CD8⁺, cuantificamos la proliferación *in vitro* de las células T CD8⁺ tras la co-incubación previa de ambos tipos celulares. La proliferación es una característica inherente a la activación de los linfocitos T CD8⁺ y no puede considerarse que un linfocito T CD4⁺tf active un linfocito CD8⁺ si no provoca en éste un estímulo de proliferación (Bedoui et al., 2016). Los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* WT o los linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA se seleccionaron por “*sorting*” tras la captura de bacterias, para aumentar al máximo posible

Figura 4.13

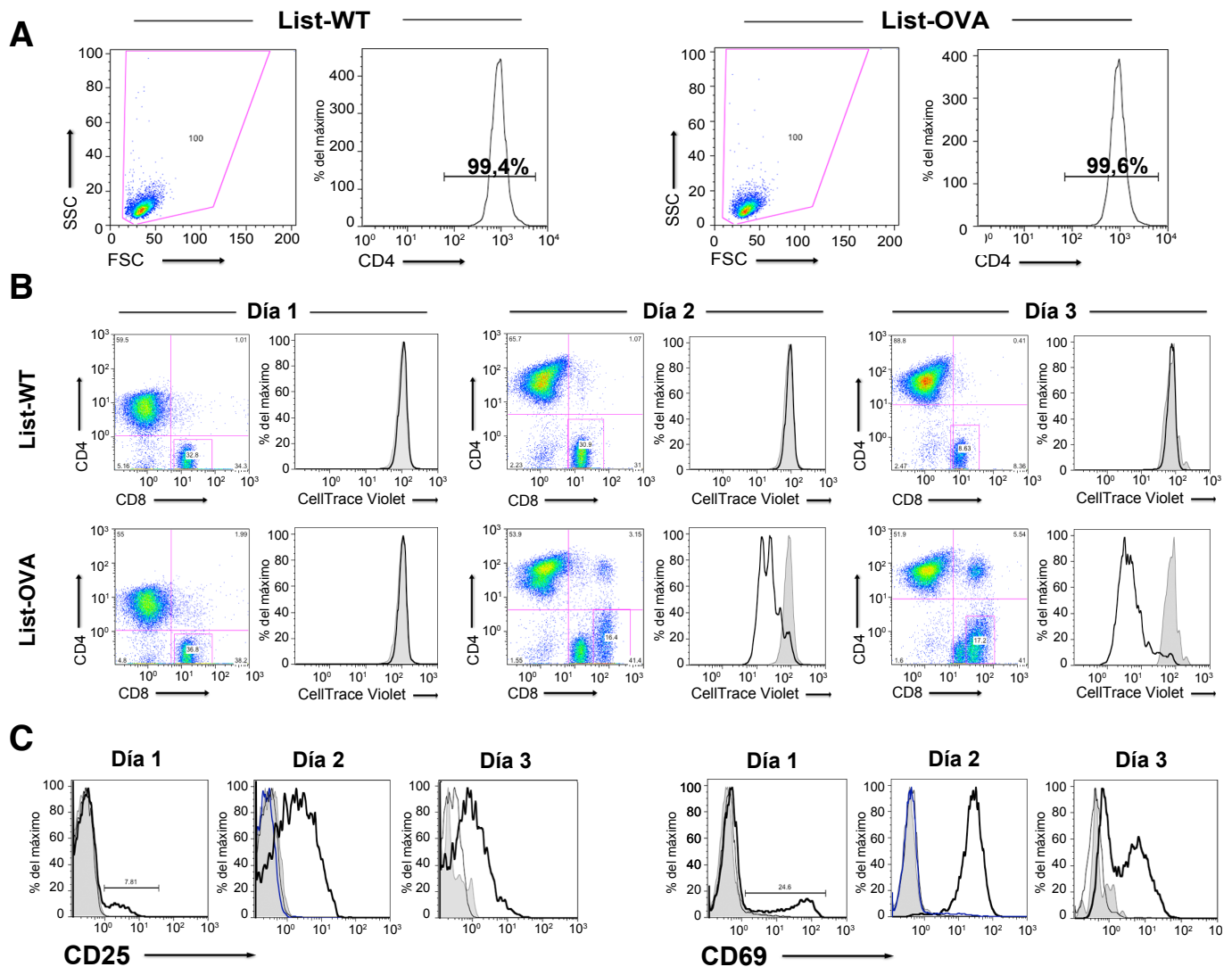


Figura 4.13. Los linfocitos CD4⁺tf presentan antígenos de las bacterias que degradan, activando células T CD8⁺ (presentación cruzada). (A) Controles de la pureza de la separación de los linfocitos T CD4⁺tf analizados por citometría de flujo. Se analiza tanto el tamaño y complejidad de las muestras (figuras de la izquierda) como expresión de CD4 (figuras de la derecha). También se analiza la ausencia de marcadores de otros tipos celulares tales como CD11c (no mostrado). Esto se hace para todos los experimentos. (B) Análisis de proliferación in vitro de linfocitos T CD8⁺ aislados de ratones OT-I (marcados con Celltrace Violet), usando linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT o T CD4⁺tf *Listeria*-OVA como células presentadoras de antígenos. Los linfocitos T CD4⁺tf se reaislaron por sorting tras la transfangocitosis para maximizar su pureza y estuvieron en contacto con los linfocitos T CD8⁺ durante tres días. Se siguió, por citometría de flujo, la proliferación de la población CD8⁺ cada día. Se representa a la izquierda un diagrama con las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. Nótese que solo se han incluido aquí las células vivas. Se indica mediante un recuadro en rojo la población T CD8⁺ de la que se analiza su proliferación por dilución del marcador Celltrace Violet. (C) Expresión de CD69 y CD25 por parte de los linfocitos T CD8⁺ activados con los linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT (línea fina negra) o con los CD4⁺tf *Listeria*-OVA (línea gruesa negra). La población de los linfocitos T CD8^{low} no proliferativa se muestra como línea azul y la población de linfocitos T CD8⁺ no activada que usamos como control en gris.

Resultados

su pureza. El *sorting* permite asegurarnos de que la pureza de los linfocitos T CD4⁺ que procesamos es máxima, evitando así la posible presencia de DC contaminantes (Figura 4.13 A).

En paralelo, se aislaron los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de un ratón transgénico OT-I, y se marcaron con un colorante celular fluorescente (*CellTrace Violet*), que nos permitiría cuantificar la proliferación de los linfocitos. En cada ronda de división se diluirá el colorante entre las células “hijas”, lo que se puede seguir fácilmente por citometría de flujo (Karrich et al., 2013).

En resumen, tenemos 3 poblaciones de células: linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* WT, linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA y linfocitos T CD8⁺ vírgenes, éstos últimos marcados con *CellTrace Violet*. Los linfocitos T CD4⁺tf se cultivaron con los linfocitos T CD8⁺ en una proporción 1:1. Tras 24, 48 y 72 horas los cocultivos de células T CD4⁺-T CD8⁺ se analizaron por citometría de flujo. Los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA (pero no linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* WT) fueron capaces de activar de forma muy potente la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ de ratón OT-I. Esta proliferación empieza a ser visible a día 2 y aumenta enormemente en las mediciones sucesivas. Esta activación de los linfocitos T CD8⁺ (en la condición con linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA) genera dos poblaciones: CD8^{low} y CD8^{high}, además de una población de dobles positivos (CD4⁺ y CD8⁺) que se corresponde a los conjugados entre linfocitos T CD4⁺tf presentadores y T CD8⁺ (Figura 4.13 B). La población CD8^{high} es la que está activándose/proliferando. Estos resultados demuestran de forma clara que linfocitos T CD4⁺tf (linfocitos convencionales) son células presentadoras de antígenos *bona fide*, lo que rompe uno de los dogmas de la inmunología.

La activación de los linfocitos T CD8⁺ (de ratones OT-I), por parte de linfocitos T CD4⁺tf presentadores, se corroboró analizando la expresión de marcadores de activación tales como CD25 y CD69. Estos experimentos confirman la capacidad presentadora de los linfocitos T CD4⁺tf ya que se observa un aumento en la expresión de CD69 y CD25 en los linfocitos T CD8⁺ que han estado en contacto con linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA. No se observa activación ninguna cuando las células presentadoras fueron T CD4⁺tf-*Listeria* WT (Figura 4.13 C).

Estos resultados sorprendentes confirman los anteriores y muestran que en contra de la tesis mayoritaria en el campo de la inmunología, los linfocitos T CD4⁺ convencionales son capaces de realizar pre-

Figura 4.14

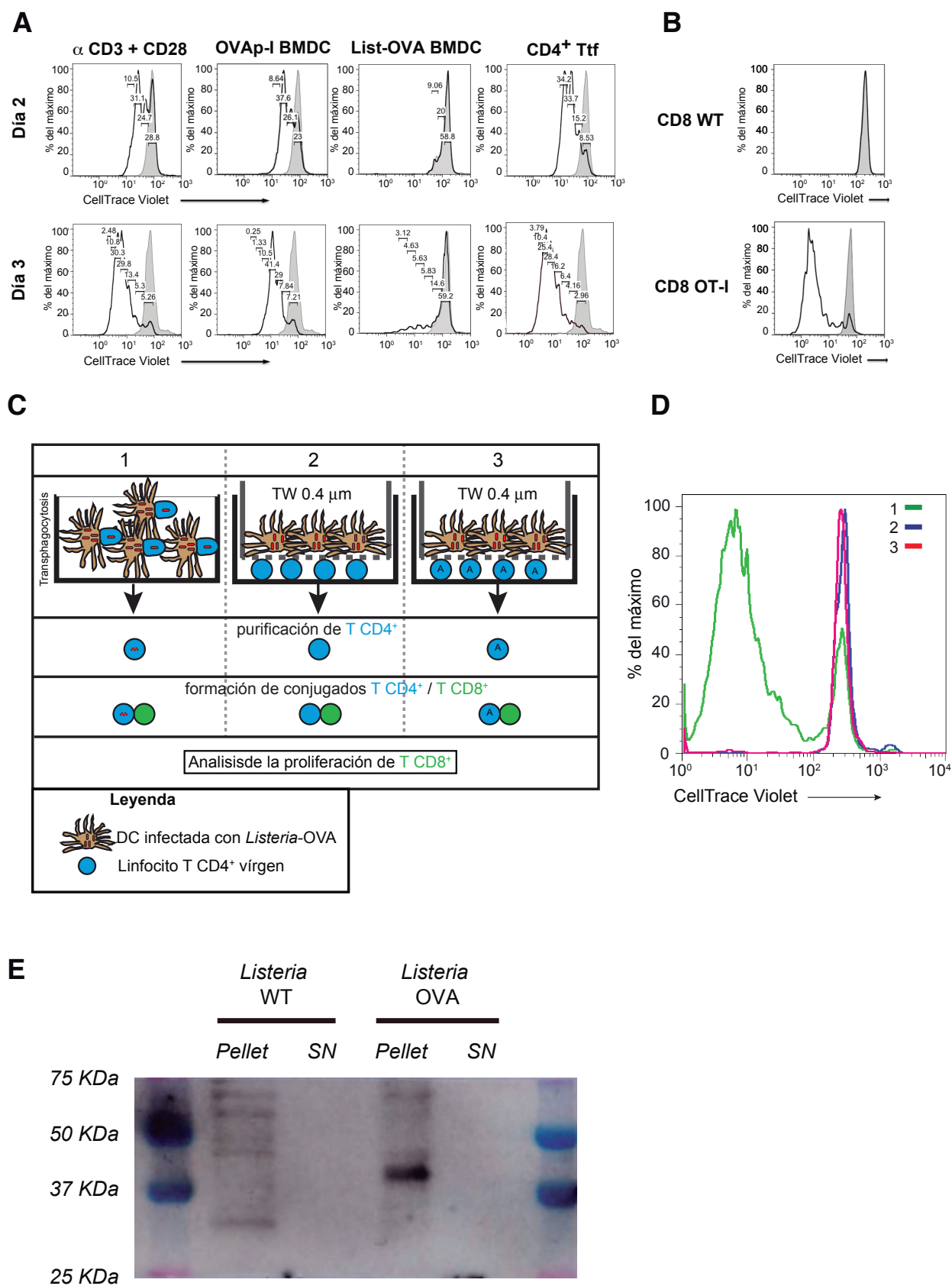


Figura 4.14 Los linfocitos T CD4⁺tf son extraordinarios presentadores antígenicos. **(A)** Proliferación de linfocitos vírgenes T CD8⁺ OT-I activados policlonalmente con anticuerpos α CD3 y α CD28 o usando células presentadoras de antígenos (BMDCs) decoradas con pOVA-I o infectadas con *Listeria*-OVA. También, en paralelo, se activan los linfocitos T CD8⁺ OT-I con linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria*-OVA y sorprendentemente los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria*-OVA activan de forma más potente a los linfocitos T CD8⁺ que el resto de controles positivos. **(B)** Proliferación de linfocitos T CD8⁺ aislados de ratones WT (arriba) o de ratones OT-I (abajo) cuando son estimulados con linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA. **(C)** Esquema de un experimento donde analizamos si la OVA de *Listeria*-OVA se adquiere por transfagocitosis o soluble desde el medio extracelular. DC infectadas con *Listeria*-OVA se pusieron en contacto con linfocitos T CD4⁺ T cells OT-II (condition 1). Alternativamente, DC infectadas con *Listeria*-OVA se crecieron sobre un filtro/barrera de policarbonato con un tamaño de poro de 0.4 μ m que permite el paso del material soluble como proteínas o exosomas pero impide el contacto celular con linfocitos T CD4⁺ OT-II no activados (condición 2) o activados "A" (en presencia de anticuerpos anti CD3 y CD28; condición 3). 16h después, los linfocitos T CD4⁺ se re-aislaron por sorting y se usaron como APC para activar a los linfocitos T CD8⁺ OT-I. **(D)** Proliferación de linfocitos T CD8⁺ OT-I 4 días tras el contacto con las células T CD4⁺ T descritas en C. La línea verde se corresponde a la condición 1, la línea azul a la condición 2 y la magenta a la condición 3. **(E)** Se analizó mediante Western blotting la expresión de OVA en *Listeria*-OVA y su isogénica WT. Se analizó la presencia de OVA tanto en las bacterias (pellet) como en el medio (SN) tras 24h de crecimiento. Se cargaron en cada carril las proteínas de $1,7 \times 10^6$ bacterias, y los sobrenadantes se concentraron aproximadamente 50 veces usando centricones de 10 kDa de tamaño de exclusión. Se detectó OVA usando un anticuerpo anti-OVA acoplado a peroxidasa (HRP) por quimioluminiscencia. Se muestran marcadores de peso molecular.

sentación cruzada de antígenos de las bacterias que capturan y degradan, activando de forma muy potente a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes, lo que podría ser de gran relevancia en procesos como respuesta a patógenos o inmunoterapias contra el cáncer.

Se comparó la capacidad de activación de los linfocitos T CD4⁺tf a linfocitos T CD8⁺ con varios controles positivos. Los linfocitos T CD8⁺ (OT-I) vírgenes se activaron con anticuerpos contra CD3 y CD28 (activación policlonal), usando DC decoradas con pOVA-I y usando DC infectadas con *Listeria*-OVA. Sorprendentemente la capacidad de activación de los linfocitos T CD4⁺tf fue superior a la de todos los controles positivos incluido el de DC decoradas con péptido pOVA-I (Figura 4.14 A).

Como control de especificidad, se cultivaron linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA junto con linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratón WT, o de ratón transgénico OT-I. Solo proliferaron los linfocitos T CD8⁺ de ratón OT-I, que reconocen pOVA-I, confirmando que la proliferación observada es antígeno específica (Figura 4.14 B).

Aunque existen datos de experimentos *in vitro*, que muestran que los linfocitos T CD4⁺ pueden captar antígenos solubles del medio y presentarlos vía MHC-II (Barnaba et al., 1994; Lanzavecchia et al., 1988), el consenso de la comunidad científica ignora esos resultados, y no se considera que los linfocitos T CD4⁺

convencionales puedan ser células presentadoras antígenos. Nuestros datos van mucho más allá, proponemos no solo que los linfocitos son *bona fide* APC, con funciones que se creen exclusivas de las DC, sino que pueden presentar los antígenos de bacterias que degradan. Para determinar si la presentación en superficie del antígeno OVAp-I asociado a MHC-I, es debido al procesamiento de las bacterias que capturan por transfagocitosis, y no a una captura del antígeno soluble, analizamos la expresión de OVA por parte de *Listeria*-OVA. Experimentos de *Western blot* confirmaron la expresión intracelular (en el interior de la bacteria) de ovoalbúmina en la cepa *Listeria*-OVA, y no se detectó en el medio extracelular de cultivos crecidos durante 12h (Figura 4.14 E).

Aunque no fuimos capaces de detectar los niveles de ovoalbúmina en el sobrenadante de las bacterias, no podemos descartar que haya niveles no detectables de OVA, o fragmentos de OVA no detectados con el anticuerpo y por ello decidimos realizar un experimento para determinar si la OVA presentada por los linfocitos T CD4⁺tf es captada desde el medio extracelular o capturada por transfagocitosis. Comparamos la capacidad presentadora de linfocitos T CD4⁺ que tuvieron contacto físico con DC infectadas (con *Listeria*-OVA) o con linfocitos T CD4⁺ (activados policlonalmente con anti CD3 y anti CD28, o no activados) a los que se les impidió el contacto físico con las DC infectadas mediante una separación física (filtro de polycarbonato de 0.4 µm; transwell), pero que sí permite el paso de moléculas solubles y exosomas (Figura 4.14 C explica esta última condición). Tras 16 horas de co-cultivo se seleccionaron negativamente los linfocitos T CD4⁺ y se co-cultivaron durante 4 días con los linfocitos T CD8⁺ OT-I. Los resultados muestran que los linfocitos T CD4⁺ que no han establecido contacto físico con DC infectadas no presentan pOVA-I (Figura 4.14 D), lo que indica que la ovoalbúmina que capturan y presentan los T CD4⁺tf no es de origen extracelular soluble, sino que se captura por transfagocitosis.

4.13 Los linfocitos T CD4⁺tf procesan los antígenos bacterianos endógenamente

La activación de linfocitos T CD8⁺ por parte de los linfocitos T CD4⁺tf puede ser debido a un procesamiento antigénico por parte de los linfocitos, o también podría ser debido a que estos capturen comple-

Figura 4.15

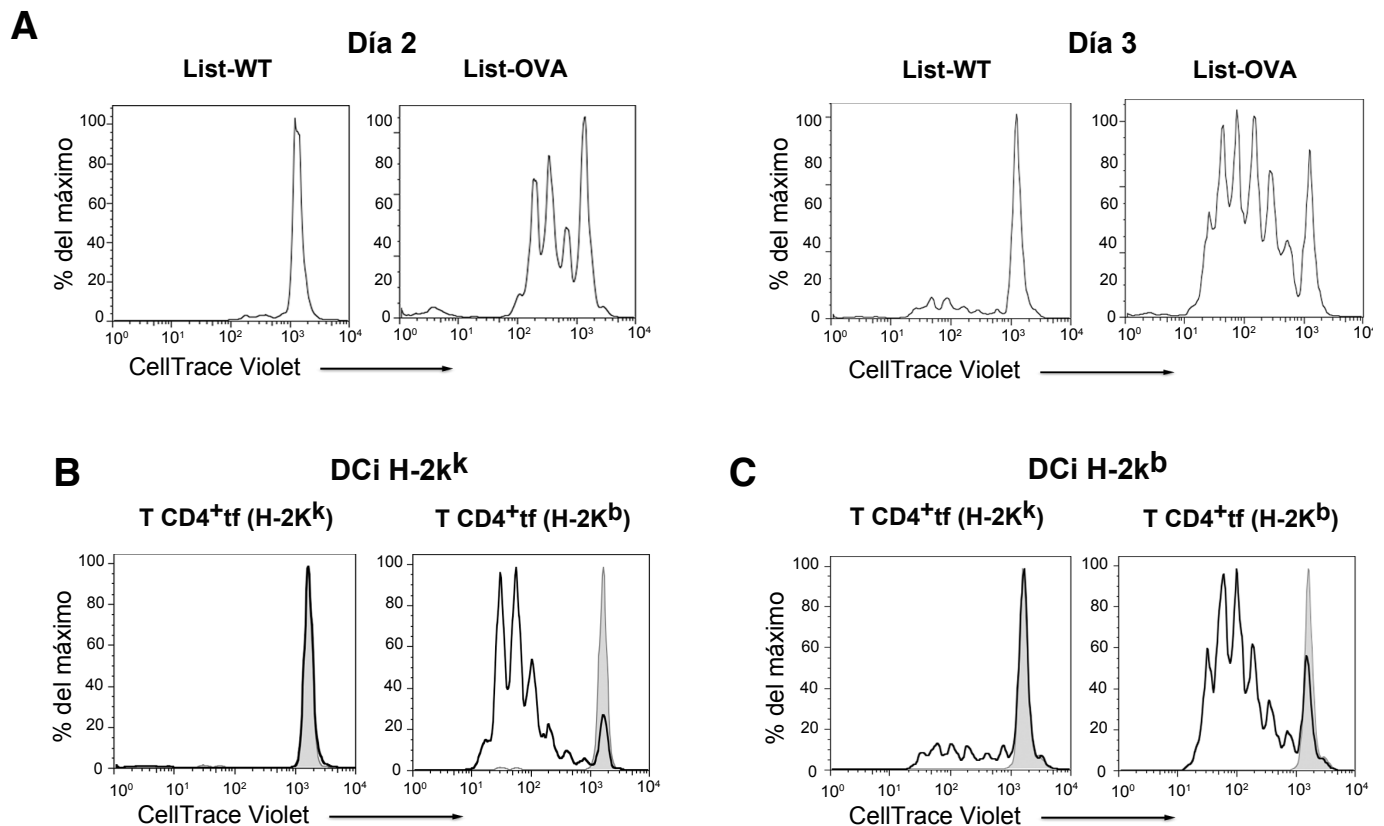


Figura 4.15 Los linfocitos T CD4⁺tf procesan (y presentan) los antígenos bacterianos de forma endógena. (A) Proliferación de linfocitos T CD8⁺ de ratón OT-I estimulados con linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA o linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT. En ambos casos, las DC vehículo se decoraron con pOVA-I. Si las DCs (por contaminación), o la captura por parte de los linfocitos T CD4⁺tf de moléculas MHC-I de estas DC por trogocitosis jugase un papel fundamental en la activación de los linfocitos T CD8⁺, en ambas condiciones la estimulación de las células T CD8⁺ debería de ser parecida. En la figura se representan los histogramas de la intensidad de CellTrace Violet en la población linfocitos T CD8⁺ a día 2 (izquierda) o 3 (derecha) tras el contacto con los linfocitos T CD4⁺tf actuando como APCs. (B) Proliferación de linfocitos T CD8⁺ de ratón OT-I estimulados con linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA o linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT. Estos linfocitos T CD4⁺tf expresaban en un caso MHC-I con haplotipo H-2K^b (pueden estimular a los linfocitos T CD8⁺ OT-I; en el panel de la derecha), o haplotipo H2K^k (no pueden estimular a los linfocitos T CD8⁺ OT-I; en el panel de la izquierda). En ambos casos las DC vehículo expresaban MHC-I con haplotipo H-2K^k. Las gráficas representan los histogramas de intensidad de CellTrace Violet en de los linfocitos T CD8⁺, en blanco se representa a la población que estuvo en contacto con los linfocitos T CD4⁺tf con *Listeria*-OVA y en gris la que estuvo en contacto con los linfocitos T CD4⁺tf *Listeria* WT. (C) El mismo experimento que el mostrado en B, pero las DC vehículo expresaban MHC-I con haplotipo H-2K^b.

jos MHC-I/antígeno desde las DC por trogocitosis (Wetzel and Parker, 2006). Para discernir entre estas posibilidades, se decoraron DC (infectadas) de ratón WT con pOVA-I, reconocido por linfocitos T CD8⁺ OT-I. Usando estas DC como vehículo para la transfangocitosis, se generaron linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* WT o bien linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA que se re-purificaron y pusieron en contacto con linfocitos T CD8⁺ OT-I para analizar su proliferación a día 2 o 3 después del cocultivo (Figura 4.15 A). Si la activa-

ción de los linfocitos T CD8⁺ fuese debida a la trogocitosis de complejos MHC-I/pOVA-I desde las DC, la activación de los linfocitos T CD8⁺ sería similar en ambos grupos experimentales, pero los resultados muestran una activación mucho mayor en el grupo con linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA. Esto indica que la presentación antigénica se produce de forma mayoritaria por procesamiento de las bacterias por parte de los linfocitos T CD4⁺tf. Nuestros datos indican además que la trogocitosis existe, pero es residual en cuanto a la activación de las células T CD8⁺ comparada con el procesamiento antigénico por parte de las células T CD4⁺.

Para confirmar estos resultados, y para descartar cualquier aportación a la presentación antigénica por una posible contaminación de DC, usamos DC que expresan un haplotipo de MHC-I, H-2K^k, que es incapaz de cargar el péptido pOVA-I (Carbone and Bevan, 1989) y por lo tanto no puede activar a las células T CD8⁺ de los ratones OT-I. Las DC H-2K^k infectadas con *Listeria*-OVA se pusieron en contacto con linfocitos T CD4⁺ H-2K^k o H-2K^b durante 48 horas. Los linfocitos T CD4⁺tf re-purificados se pusieron en contacto con linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratones OT-I durante 3 días, y se analizó su proliferación por citometría de flujo. Dado que los linfocitos CD8⁺ de ratón OT-I sólo reconocen pOVA-I unido a H-2K^b, la condición de linfocitos T CD4⁺tf H-2K^b representa la contribución de los linfocitos CD4⁺tf a la presentación antigénica, puesto que las DC (H-2K^k) no pueden contribuir a la misma. Solo los linfocitos T CD4⁺tf H-2K^b fueron capaces de inducir la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ OT-I (Figura 4.15 B). Estos resultados muestran por una parte que las DC no son estrictamente necesarias como APC para estimular la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, y además descartan que exista alguna aportación a la presentación antigénica debida a una posible contaminación con DC. Además, confirma que son los linfocitos T CD4⁺tf, los que procesan y presentan los antígenos bacterianos.

Puesto que habíamos observado una contribución menor de la trogocitosis, a la actividad presentadora de los linfocitos CD4⁺tf, realizamos un experimento para confirmar si la trogocitosis puede jugar algún papel en la presentación antigénica. DC H-2K^b infectadas con *Listeria*-OVA formaron conjugados con linfocitos T CD4⁺ H-2K^b o H-2K^k. En este experimento los MHC-I de las DC infectadas sí pueden contribuir a la presentación antigénica. De hecho, cuando los linfocitos T CD4⁺tf expresan el haplotipo H-2K^k sólo será posible la activación de los linfocitos T CD8⁺ OT-I si ha existido trogocitosis y los linfocitos T

Figura 4.16

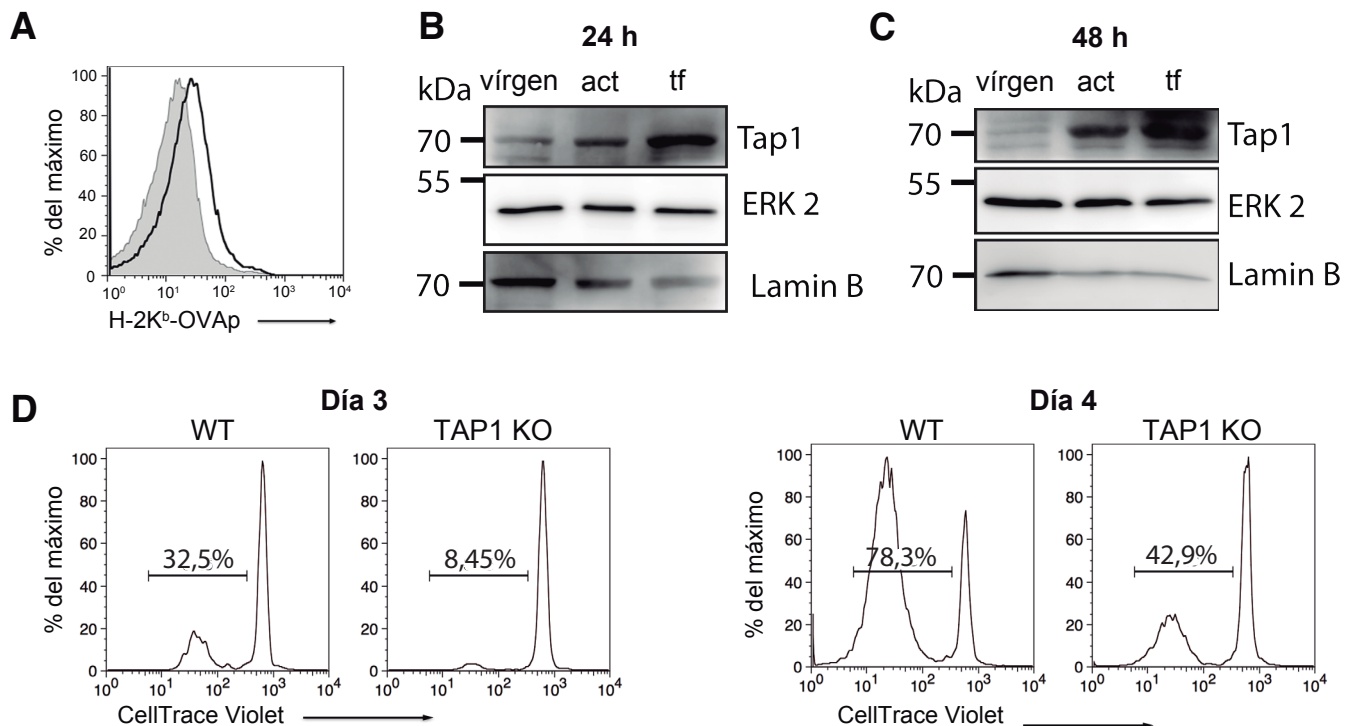


Figura 4.16 El procesamiento de los antígenos bacterianos por parte de los linfocitos CD4⁺tf requiere de TAP1 (procesamiento canónico). (A) Expresión en superficie del complejo H2-K^b-OVAp-I en los linfocitos CD4⁺tf *Listeria*-OVA que expresaban H-2K^b (línea negra más gruesa y sin relleno) y los que expresaban H-2K^k (histograma gris). Se muestra un histograma de fluorescencia de la señal producida por el anticuerpo que reconoce los complejos H2-K^b-pOVA-I. (B, C) Expresión de TAP1, analizada por Western-blotting en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes, los linfocitos T CD4⁺ activados con BM-DC decoradas con pOVA-II, o los linfocitos CD4⁺tf *Listeria*-OVA estimulados 24h (B) o 48 horas (C). También se muestra la expresión ERK y lamina B como controles de carga. (D) Proliferación de linfocitos T CD8⁺ OT-I, marcados con CellTrace Violet, activados con linfocitos CD4⁺tf *Listeria*-OVA de ratones WT o de ratones TAP1 KO, como células presentadoras de antígenos. Se muestra la proliferación a día 3 (izquierda) y día 4 (derecha).

CD4⁺tf han capturado MHC-I H-2K^b de las DC. Los linfocitos T CD4⁺tf H-2K^b serán capaces de presentar antígenos tanto por procesamiento interno como por trogocitosis. Los resultados (Figura 4.15 C) confirman que existe presentación antigénica asociada a la trogocitosis, pero es minoritaria, el grueso de la presentación antigénica se produce por el procesamiento interno de los linfocitos T CD4⁺tf. Apoyando esta conclusión, experimentos de citometría de flujo muestra una mayor cantidad de complejos H-2K^b-OVA en la población de linfocitos T CD4⁺tf H-2K^b-*Listeria*-OVA (Figura 4.16 A).

El mecanismo de presentación cruzada ha sido descrito en DC, y se conocen moléculas clave en

Figura 4.17

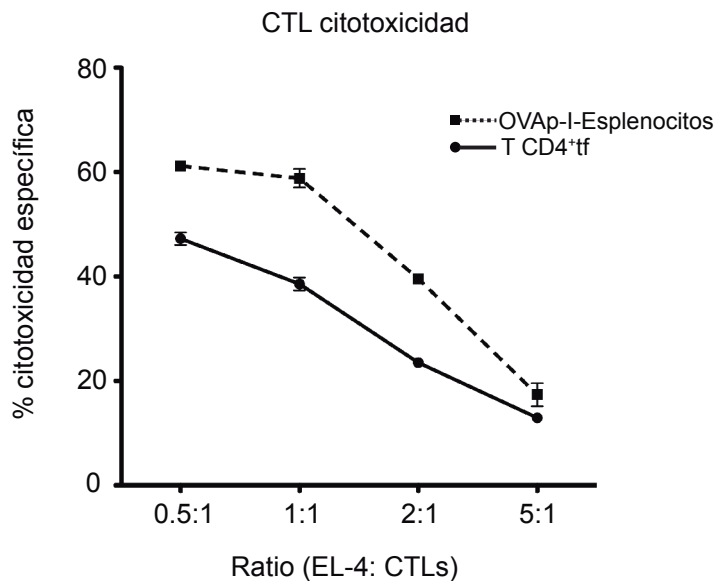
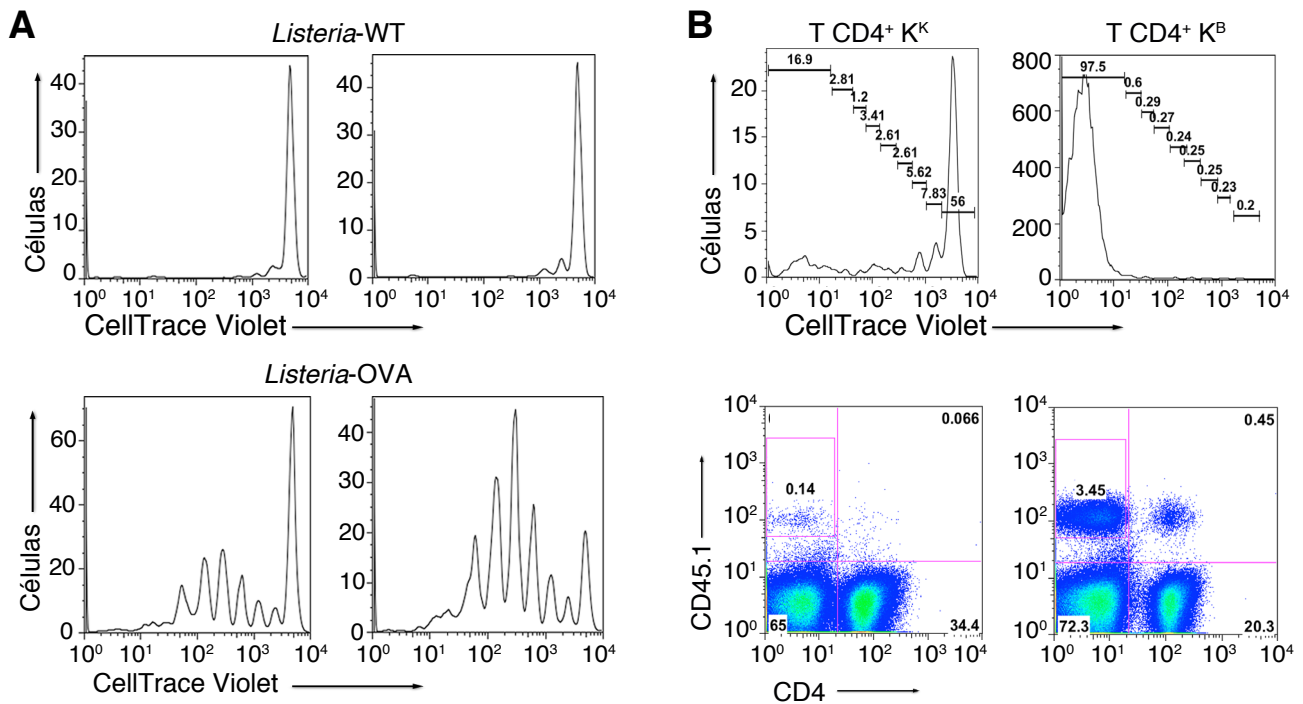


Figura 4.17 La activación mediada por T CD4⁺tf produce linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Ensayo de citotoxicidad específica de los linfocitos T CD8⁺ activados por linfocitos T CD4⁺tf (círculos unidos por línea continua) o bien por esplenocitos (control positivo, cuadrados unidos por línea punteada). Los resultados se expresan en % de citotoxicidad específica, fruto de una ecuación mostrada en materiales y métodos, a varios ratios EL-4/CTL.

este proceso, como TAP1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*), proteína participante en la translocación de los péptidos procedentes de la degradación del citosol al retículo endoplásmico, donde se ensamblan en los complejos MHC-I (Dudziak et al., 2007; Raghavan et al., 2008). Primero, analizamos los niveles de TAP1 en linfocitos T CD4⁺ vírgenes, activados con DC no infectadas, o activados con DC infectadas (transfagocíticos). La expresión de TAP1 aumenta en los linfocitos con la activación, pero su aumento es claramente superior en los linfocitos transfagocíticos (Figura 4.16 B-C). A continuación, para comprobar si TAP1 tiene un papel relevante en la presentación cruzada de los linfocitos T CD4⁺tf, usamos células T CD4⁺ de ratones TAP1 KO (Van Kaer et al., 1992). Se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T CD8⁺ OT-I usando como células presentadoras linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA de ratones TAP1 KO o de ratones WT. La proliferación de los linfocitos T CD8⁺ OT-I resultó ser superior cuando los linfocitos T CD4⁺tf eran WT que cuando eran deficientes para TAP1 (Figura 4.16 D), revelando una disminución en la capacidad presentadora de los linfocitos T CD4⁺tf TAP1 KO, e indicando que los linfocitos T CD4⁺tf usan el mecanismo canónico, de presentación cruzada.

Figura 4.18



C

Presentación cruzada de antígenos bacterianos por linfocitos T CD4⁺ durante infección bacteriana

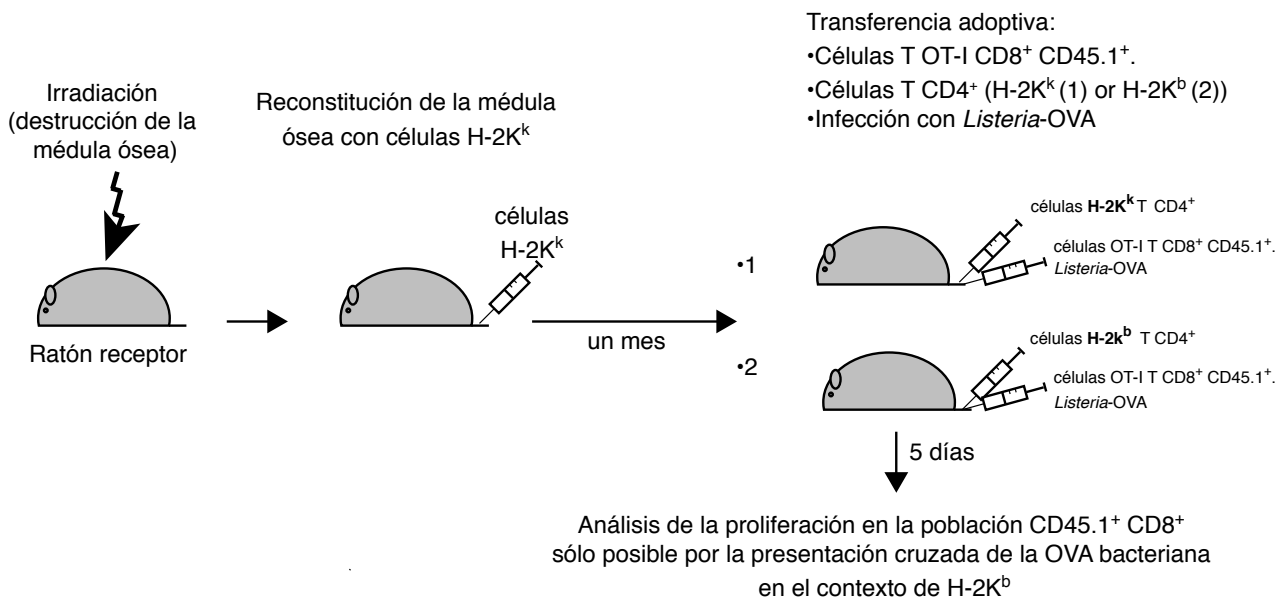


Figura 4.18 Presentación cruzada de linfocitos T CD4⁺tf *in vivo*. **(A)** Proliferación *in vivo* de linfocitos T CD8⁺ CD45.1 de ratones OT-I marcados con CellTrace Violet, transferidos (vía i.v.) a ratones receptores WT CD45.2. A los ratones receptores se les inyectaron 2×10^6 (paneles de la izquierda) o 5×10^6 (paneles de la derecha) linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-WT (panel superior) o linfocitos T CD4⁺tf *Listeria*-OVA (panel inferior). Se analizó por citometría de flujo la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ transferidos a día 3 tras la inyección de los linfocitos T CD4⁺tf presentadores. Los histogramas representan la intensidad de fluorescencia de Celltrace Violet en la población CD45.1⁺. **(B)** Proliferación *in vivo* de linfocitos T CD8⁺ CD45.1 de ratones OT-I marcados con CellTrace Violet, transferidos (vía i.v.) a ratones receptores. Estos ratones WT receptores fueron previamente irradiados y se les reconstituyó la médula con progenitores de ratones con haplotipo H-2K^k y CD45.2. A los ratones receptores también se les transfirieron (vía i.v.) linfocitos T CD4⁺ de haplotipo H-2K^k (panel izquierdo) o linfocitos T CD4⁺ de haplotipo H-2K^b (panel derecho). Los linfocitos T CD4⁺ en los dos casos eran CD45.2. Además, también se inyectó vía intravenosa *Listeria*-OVA. En los paneles superiores se muestra la proliferación analizada por citometría de flujo de la población CD45.1⁺, 5 días tras la inyección de las bacterias. En los paneles inferiores se muestra la población total de un bazo marcada con anticuerpos anti CD45.1 y anti CD4. Solo cuando las células presentadoras son linfocitos T CD4⁺ de haplotipo H-2K^b observamos una proliferación de los linfocitos T CD8⁺ OT-I. Esto confirma que la transfagocitosis y la presentación cruzada mediada por linfocitos T CD4⁺tf es muy efectiva también en un modelo *in vivo* **(C)** esquema del experimento mostrado en B.

4.14 Los linfocitos T CD4⁺tf activan a los linfocitos CD8⁺ hasta el estadio CTL

Para comprobar si las células T CD8⁺ activadas por los linfocitos T CD4⁺tf son citotóxicas, realizamos un ensayo de citotoxicidad específica usando la línea celular EL-4, la cual tiene una alta expresión de MHC-I (H-2K^b), decorada o no con pOVA-I (\pm pOVA-I). Estas células se marcaron con el agente de tinción fluorescente CFSE de forma diferencial (EL-4-pOVA CFSE^{high} y EL-4 CFSE^{low}) para poder ser diferenciadas por citometría de flujo. Seguidamente las incubamos en diferentes proporciones con linfocitos T CD8⁺ activados (CTLs), purificados de un co-cultivo de 7 días con linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA. Como control positivo usamos esplenocitos de ratón OT-I (CTLs generados desde un bazo de ratón OT-I disgregado e incubado con pOVA-I), además de un control negativo de muerte espontánea de células EL-4 en ausencia de CTLs. Tras 4 horas de cultivo se analizó la citotoxicidad específica (ver materiales y métodos). Los resultados muestran una muerte celular de la población EL-4-pOVA, y no de la EL-4, en presencia de T CD4⁺tf-*Listeria* OVA, demostrando que los linfocitos T CD4⁺tf inducen una clara citotoxicidad específica (Figura 4.17). Este experimento confirma la activación completa de los linfocitos T CD8⁺ por los linfocitos T CD4⁺tf, y su conversión en CTLs.

4.15 Los linfocitos T CD4⁺tf son capaces de realizar presentación cruzada a células CD8⁺ *in vivo*

Para analizar si la presentación antigénica mediada por los linfocitos T CD4⁺tf también ocurre *in vivo*, diseñamos un experimento de transferencia adoptiva. Aislamos células T CD8⁺ vírgenes de un ratón OT-I/CD45.1 (el receptor CD45.1 nos permitirá trazar la población por citometría de flujo cuando se introduzcan en ratones CD45.2), las teñimos con “CellTrace Violet”, para inyectarlos en ratones receptores WT/CD45.2. Tras 24 horas, los ratones se dividieron en dos grupos, a los cuales se les inyectaron linfocitos T CD4⁺tf -*Listeria* WT o linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA. Al tercer día tras la transferencia adoptiva, se sacrificaron los ratones y se analizaron las poblaciones celulares del bazo de cada ratón por citometría de flujo. Los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* OVA (pero no los linfocitos T CD4⁺tf-*Listeria* WT) activaron de forma muy potente a los linfocitos T CD8⁺ OT-I, corroborando los resultados obtenidos *in vitro* (Figura 4.18 A).

Alternativamente realizamos otro experimento, para determinar el rol de la transfagocitosis *in vivo* en la presentación antigénica en un modelo de infección. Irradiamos ratones WT y reconstituimos sus medulas óseas con progenitores de ratones con haplotipo H-2K^k de MHC-I, incapaces de presentar el péptido pOVA-I. Un mes después de la irradiación, se comprobó por citometría su reconstitución (datos no mostrados) y se les inyectó a los ratones recipientes linfocitos T CD4⁺ de ratones AND (H-2K^k o H-2K^b) junto con células T CD8⁺ CD45.1 vírgenes y péptido MCC (péptido 88-103 del citocromo C de polilla, *Moth Cytochrome C*, MCC) (Page et al., 1997) para favorecer la transfagocitosis en el modelo AND). 24 horas después se infectaron todos los ratones con *Listeria*-OVA por vía intravenosa, en dosis sub-lethal. 5 días después de la infección se sacrificaron los ratones y se analizaron las poblaciones del bazo por citometría de flujo. Los linfocitos T CD8⁺ CD45.1 proliferaron de forma masiva pero solo en presencia de linfocitos T CD4⁺tf H-2K^b, confirmando que la transfagocitosis se puede dar *in vivo* y que los linfocitos T CD4⁺tf son células presentadoras de antígenos (Figura 4.18 B). Para la mejor comprensión del experimento, se facilita un esquema en Figura 4.18 C.

Figura 4.19

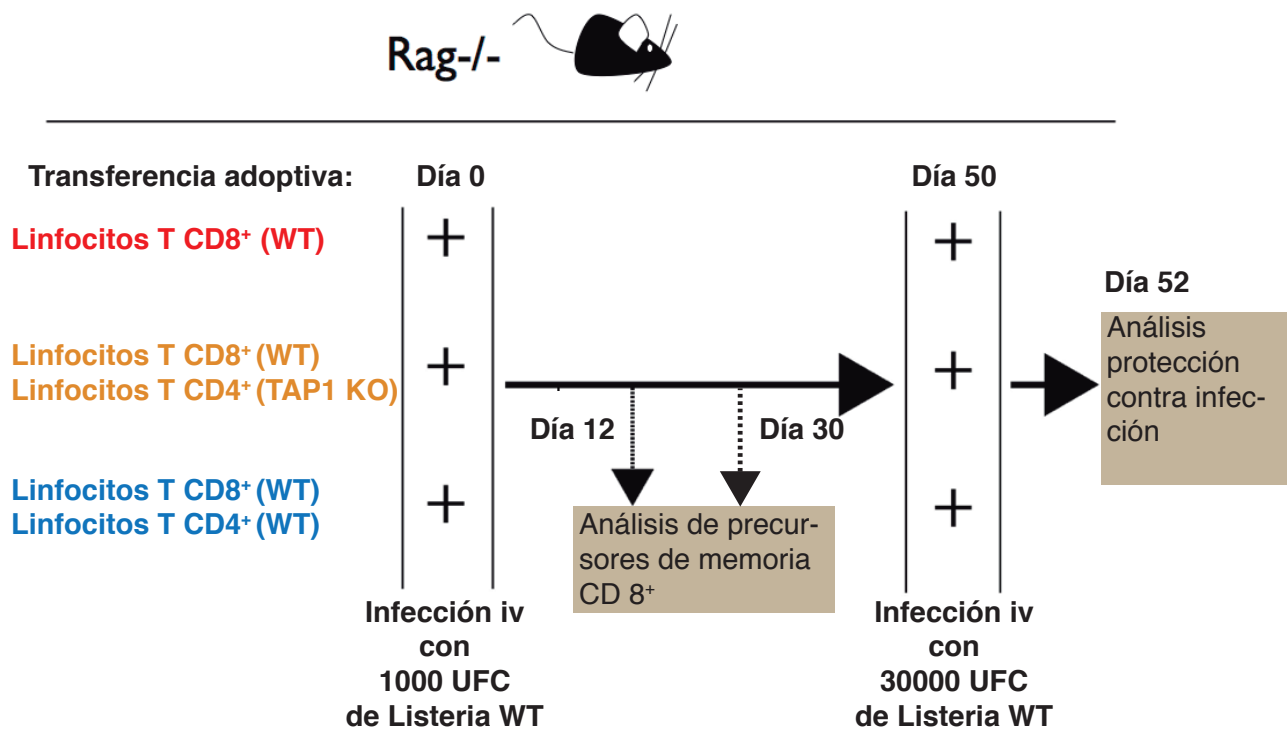


Figura 4.19 Esquema de experimento para analizar el papel de los linfocitos T CD4⁺ en la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria. (A) Ratones Rag-1 KO fueron usados como recipientes de tres grupos experimentales: 1. linfocitos T CD8⁺ (WT), linfocitos T CD8⁺ (WT) junto con linfocitos T CD4⁺ (TAP1 KO) o bien linfocitos T CD8⁺ (WT) junto con linfocitos T CD4⁺ (WT). Todos los ratones se infectaron con 1000 UFCs de *L. monocytogenes*. 12 días tras la infección se analizaron las células de los bazo de varios ratones de cada grupo. Esto mismo se repitió un mes tras la infección. En paralelo, otros ratones se re-infectaron con una dosis mayor de *L. monocytogenes* (30 000 UFC/ratón) 50 días tras la primera infección y 30 horas después se cuantificaron las UFC del bazo.

4.16 Los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel clave en la generación de linfocitos T CD8⁺ memoria

El papel que juegan los linfocitos T CD4⁺ en la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria sigue siendo objeto de intenso debate científico hoy en día. Se conoce que son necesarios, pero no está claro el mecanismo por el cual inducen la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria (Laidlaw et al., 2016). Se piensa que su papel es activar a las DC, que serían las responsables de activar a los linfocitos T CD8⁺. Se ha propuesto que la interacción CD40-CD40L activaría la capacidad de las DC para poder activar a los

Figura 4.20

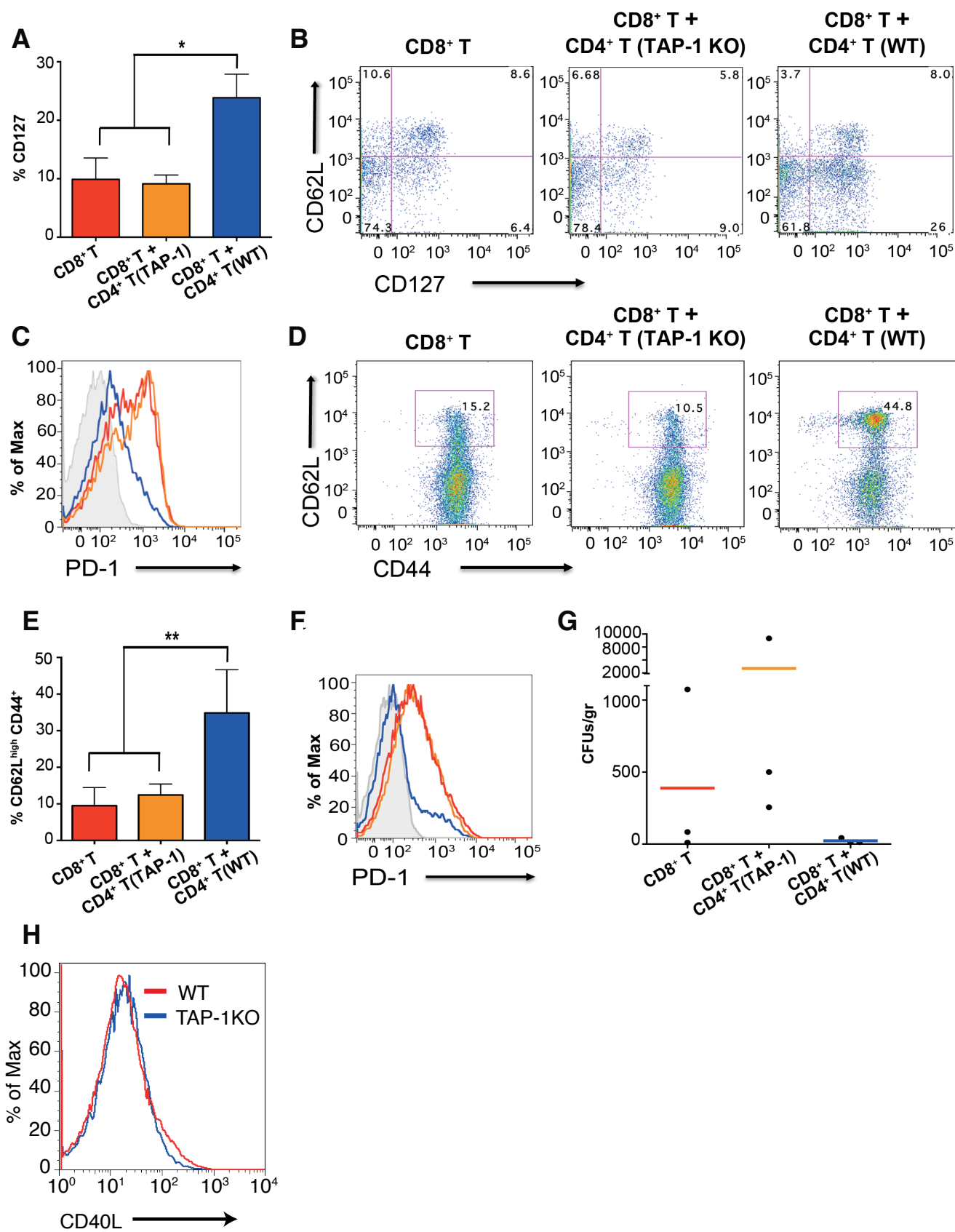


Figura 4.20 Análisis fenotípico de linfocitos T CD8⁺ memoria generados por linfocitos T CD4⁺tf *in vivo*. Se transfirieron adoptivamente (i.v) a los ratones Rag1 KO receptores los siguientes tipos celulares: sólo linfocitos T CD8⁺ WT (grupo1, rojo), linfocitos CD4⁺ TAP1 KO y CD8⁺ WT (grupo 2, amarillo) o linfocitos T CD4⁺ WT y CD8⁺ WT (grupo 3, azul). El día después todos los ratones fueron infectados i.v con *L. monocytogenes* (1000 bacterias/ratón). 12 días después (A-C) y 30 días después (D-F) las poblaciones de los linfocitos T CD8⁺ de bazo fueron analizadas. (A) Análisis del porcentaje de CD127⁺ dentro de la población CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ analizados por citometría de flujo (se muestra la media de tres ratones por grupo). (B) Expresión de CD62L y CD127 dentro de la población CD3⁺CD8⁺CD44⁺ se muestran los datos de un ratón representativo de la población por condición. (C) Histogramas indicando la expresión de PD-1 en las poblaciones CD3⁺CD8⁺CD44⁺, grupo1 (línea roja) grupo 2 (línea amarilla) y grupo 3 (línea azul) y el control sin fluorescencia (línea gris). Se muestran los datos de un ratón representativo de la población por condición. (D) Expresión de CD62L frente a CD44 en la población CD8⁺CD3⁺. Se muestran los datos de un ratón representativo de la población por condición. (E) Porcentajes de células CD62L^{high}CD44⁺ encuadradas en D. Se muestra la media de 4 ratones por grupo; grupo1 (rojo), grupo 2 (amarillo) y grupo 3 (azul), las barras de error representan la desviación estándar (sd). (F) Expresión de PD-1 en las poblaciones CD3⁺CD8⁺CD44⁺. Se muestran los datos de un ratón representativo de la población por condición. La línea roja representa el grupo 1, la amarilla el grupo 2 y la azul el grupo 3. El control sin tinción se representa en gris. (G) 50 días después de la primera infección se infectó i.v con *L. monocytogenes* (30.000 bacterias/ratón). Dos días después de la segunda infección se sacrificaron los ratones y se analizó la carga bacteriana en bazo de 3 ratones por grupo experimental. Cada punto representa el valor de un ratón, rojos grupo 1, amarillos grupo 2 y azules grupo 3. Las barras representan las medias de los valores de cada grupo. (H) Expresión de CD40L en linfocitos T CD4⁺ activadas de ratones WT y TAP1 KO.

linfocitos T CD8⁺ y encaminarlos a linfocitos T CD8⁺ memoria (Lauvau et al., 2016; Reiser and Banerjee, 2016; Sokke Umeshappa et al., 2012). Debido a estos precedentes, decidimos estudiar si la activación de linfocitos T CD8⁺ por la presentación cruzada realizada por los linfocitos T CD4⁺tf podría generar linfocitos T CD8⁺ memoria. Si esto fuese así, ampliaría el papel de los linfocitos T CD4⁺ en la generación de linfocitos T CD8⁺ memoria, rompiendo otra vez un dogma de la inmunología. Para ello, estudiamos el papel de la presentación antigénica mediada por los linfocitos T CD4⁺tf en un contexto de repertorio nativo durante una infección bacteriana. Usamos ratones transgénicos Rag1 KO (Rag^{-/-}) (Mombaerts et al., 1992) como ratones receptores, los cuales no tienen linfocitos (debido a que las enzimas Rag son claves en la recombinación e hiper-mutación tanto del TCR como el BCR). Los ratones Rag1 KO fueron divididos en 3 grupos a los cuales se les transfirió adoptivamente por vía intravenosa (iv): ninguna célula (PBS; grupo 1), linfocitos T CD4⁺ WT (grupo 2) o linfocitos T CD4⁺ TAP1 KO (grupo 3). A todos se les inyectaron (iv) linfocitos T CD8⁺ procedentes de un ratón WT. Tras 24 horas a todos los ratones se les inyectaron 1000 bacterias, *Listeria* WT, (iv) (día 0 de experimento). Los ratones se sacrificaron a días 5, 12 y 30 tras la infección, y el fenotipo de sus linfocitos T CD8⁺ fue analizado mediante citometría de flujo. El diseño del experimento se muestra en un esquema en la Figura 4.19. A día 5 tras la infección, los ratones no mostraron ninguna diferencia en sus poblaciones de linfocitos T CD8⁺ (datos no mostra-

dos). A día 12, tras la infección el grupo de ratones transferido con linfocitos T CD4⁺ WT muestran hasta 3 veces más linfocitos T CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L⁺CD127⁺ (Figura 4.20 A-B). CD127, receptor de IL-7 ha sido descrito como un receptor presente en los precursores de los linfocitos T CD8⁺ memoria (Boettler et al., 2006; Huster et al., 2004). Estos resultados demuestran que los linfocitos CD4⁺tf juegan un papel fundamental en la generación de linfocitos T CD8⁺ pre-memoria. Nótese que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ no varía significativamente entre los grupos de ratones (datos no mostrados). Yendo más lejos, el análisis de los niveles de expresión de PD-1 en las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ pre-memoria muestra una expresión altamente reducida de PD-1 en el grupo de ratones transferido con linfocitos T CD4⁺ WT (Figura 4.20 C). Los resultados del análisis tras 30 días de infección muestran la misma tendencia pero más pronunciada, en el grupo de ratones transferidos con linfocitos T CD4⁺ WT observamos niveles significativamente superiores de linfocitos CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L^{high}CCR7⁺CD127⁺ considerados memoria central (Bjorkdahl et al., 2003) (Figura 4.20 D-E). Los niveles de expresión de PD-1 en los linfocitos T CD8⁺ de los ratones transferidos con linfocitos T CD4⁺ WT son significativamente inferiores a los del resto de grupos (Figura 4.20 F), indicando que la respuesta generada por los linfocitos T CD4⁺tf podría ser más resistente al proceso denominado “extenuación” de la respuesta de los CTL.

Para corroborar el papel fisiológico de la transfagocitosis y los efectos fisiológicos del fenotipo observado por citometría a días 12 y 30 tras la primera infección re-infectamos con 30.000 bacterias (50% of lethal dose, LD50), *Listeria* WT, a cada ratón i.v. Tras 48 horas los ratones fueron sacrificados, se pesaron y disgregaron sus bazo para luego sembrar diluciones seriadas de los mismos en placas de BHI-Agar. Tras 48 horas de incubación se contaron las colonias y se infirió el número de UFCs por gramo de órgano (Figura 4.19 G), comprobando que los ratones transferidos con linfocitos T CD4⁺ WT muestran una mayor capacidad de respuesta frente a segundas infecciones. Nótese que los ratones transferidos con linfocitos T CD4⁺ TAP1 KO se comportan de forma similar a los ratones sin linfocitos T CD4⁺, expresando unos niveles de CD40L similares a los de linfocitos T CD4⁺ de ratones WT (Figura 4.20 H).

Figura 4.21

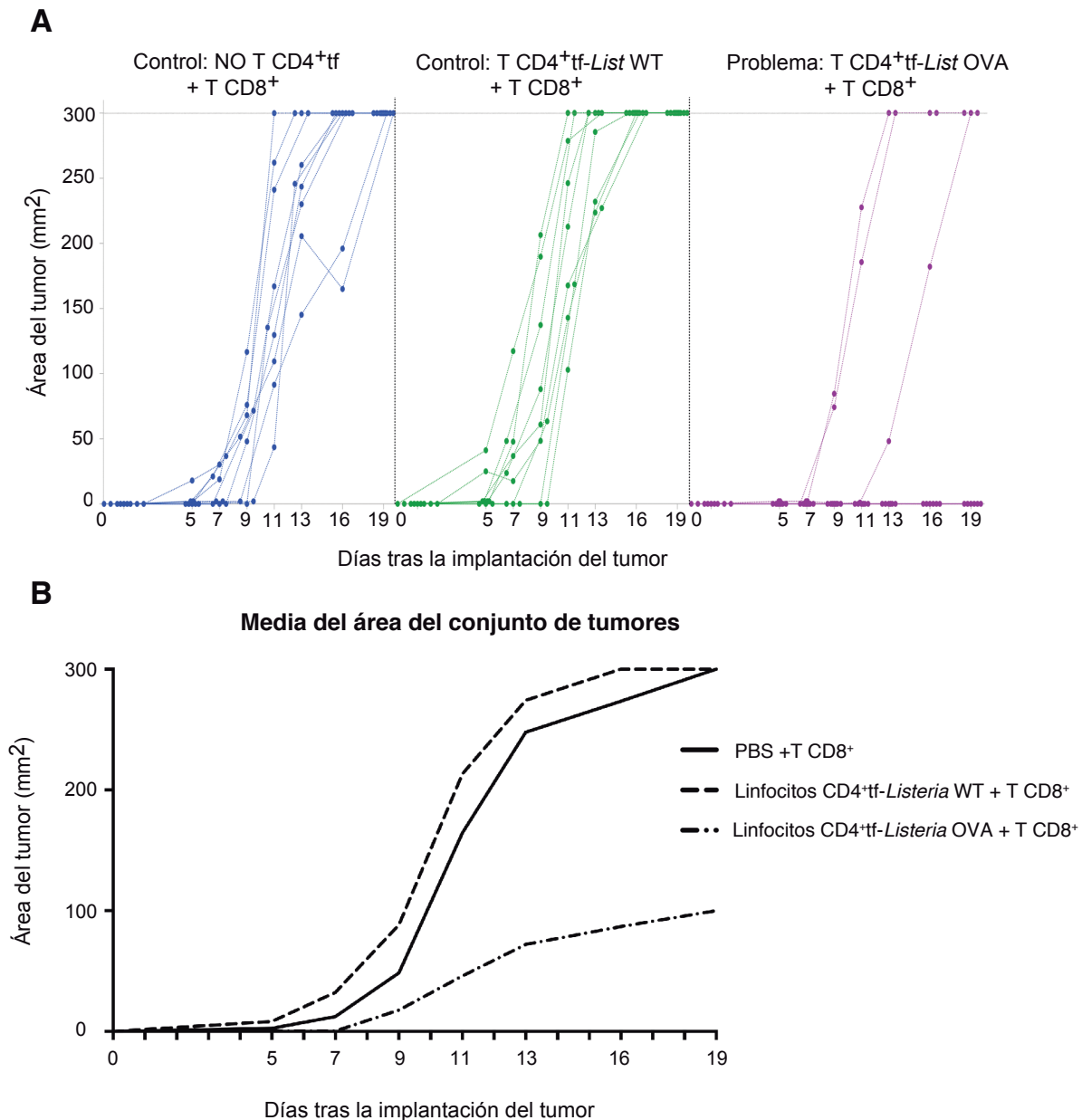


Figura 4.21 Prueba de concepto de los linfocitos T CD4^{tf} como nueva generación de inmunoterapias contra el cáncer. (A) Progresión de melanoma agresivo B-16 OVA. Ratones WT fueron inyectados subcutáneamente con una línea tumoral (B16-OVA), y separados en tres grupos experimentales de 9 ratones cada uno. A los ratones del grupo control 1, se les inyectaron PBS (izquierda, en azul), a los ratones del grupo control 2, se les transfirieron vía intravenosa los linfocitos T CD4^{tf} *Listeria*-WT (centro, en verde), y a los ratones del grupo problema, se les inyectaron los linfocitos CD4^{tf} *Listeria*-OVA (derecha, magenta). A todos los grupos, además, se les transfirieron linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratón OT-I, con potencialidad de eliminar el tumor si se activan correctamente. El desarrollo de los tumores se cuantificó mediante mediciones del crecimiento del tumor (mm²) usando un calibre, a días 5, 7, 11, 13, 16 y 19 tras el inóculo de las células tumorales. Los ratones fueron sacrificados para evitar su sufrimiento excesivo al llegar a 300 mm² de tamaño tumoral. Cada línea punteada representa la evolución del tamaño de tumor de un ratón. **(B)** Otra forma de representar el mismo experimento mostrado en A. Cada línea representa la media de las mediciones de los tumores de cada grupo.

4.17 Los linfocitos T CD4⁺tf tienen potenciales usos en inmunoterapia contra el cáncer

Nuestros datos confirman la capacidad de los linfocitos T CD4⁺tf de activar de forma potente los linfocitos T CD8⁺, generando linfocitos T CD8⁺ memoria con una baja expresión de PD-1. Esto, junto con su actividad pro inflamatoria, sugiere que los T CD4⁺tf podrían tener un potencial uso en inmunoterapias contra el cáncer (Chen and Mellman, 2013b; Restifo et al., 2012). Nótese que los linfocitos T CD4⁺tf son capaces de activar a los linfocitos T CD8⁺ mejor incluso que las células dendríticas, que actualmente se están usando en terapias contra algunos tipos de cáncer, precisamente por su capacidad de activar las células T CD8⁺.

Como prueba de concepto del uso de los linfocitos T CD4⁺tf en inmunoterapias contra tumores, los analizamos en un modelo de melanoma agresivo de ratón (B16-OVA).

Inoculamos la línea celular B16-OVA (melanoma agresivo que expresa la ovoalbúmina) (Borroto et al., 2014) en ratones WT de forma subcutánea. 24h más tarde se inyectaron (i.v) linfocitos T CD8⁺ vírgenes de ratones OT-I a todos los ratones (9 ratones por grupo) junto con: PBS (grupo 1), células T CD4⁺tf-*Listeria*-WT (grupo2) o células T CD4⁺tf-*Listeria*-OVA (grupo 3). El crecimiento de los tumores fue medido cada 2 días y los ratones que presentaban a un tamaño de tumor superior a (300mm²) se sacrificaron por normativa legal para evitar el sufrimiento animal. Los resultados muestran cómo en los grupos control, los inyectados con PBS o bien con T CD4⁺tf-*Listeria*-WT, el desarrollo del tumor se produce en el 100% de los ratones. Mientras que en el grupo tratado con T CD4⁺tf con *Listeria*-OVA el desarrollo de tumores sólo se observa en el 33,33% de los ratones (3 de 9), es decir, el ~70% de los animales tratados no desarrollan melanoma (Figura 4.21 A y B). Estos extraordinarios resultados muestran que los linfocitos T CD4⁺tf realizan presentación cruzada de manera extraordinariamente efectiva in vivo, y pueden ser una potente herramienta en inmunoterapias contra el cáncer. Nótese que en estos experimentos, sólo se inyectan los linfocitos T CD4⁺tf una sola vez, cuando en experimentos similares usando DC se hacían hasta 5 inoculaciones para tener resultados similares (Banchereau and Palucka, 2005; Mayordomo et al., 2005). Este experimento de prueba de concepto muestra que los linfocitos T

CD4⁺tf son una herramienta con un gran potencial.

Discusión

La fagocitosis se considera como una característica propia de algunos tipos celulares de la inmunidad innata, a pesar de que existen poblaciones de linfocitos capaces de capturar bacterias (por ejemplo, linfocitos T $\gamma\delta$, o linfocitos B1 (Cruz-Adalia and Veiga, 2016)). Los linfocitos T CD4⁺ convencionales, no se consideran fagocitos, a pesar de que algunos estudios muestran que pueden capturar bacterias *in vivo* (McElroy et al., 2009; Salgado-Pabon et al., 2013). Tratando de determinar la vía de captura de esas bacterias, observamos que los linfocitos, no tienen apenas capacidad para capturar las bacterias de forma directa, por fagocitosis. Por otra parte, las DC que son una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos, y las mejores células presentadoras de antígenos descritas hasta la fecha, sin embargo, no tienen la capacidad bactericida de otras células del sistema inmune innato, tales como macrófagos o neutrófilos (Delamarre, 2005b). Se ha propuesto que esta poca capacidad bactericida podría jugar un papel en la habilidad como células presentadoras de las DC (Alloatti, 2016; Delamarre, 2005b). Esta poca capacidad bactericida también podría jugar un papel relevante en la transfagocitosis por parte de los linfocitos T CD4⁺, ya que permite capturar las bacterias que las DC no eliminan. En esta tesis, nos hemos centrado en estudiar la transfagocitosis desde el punto de vista de los linfocitos T CD4⁺, sin embargo, algunos de nuestros datos, que muestran que las bacterias capturadas por las DC se polarizan hacia la IS (Figura 4.2, Vídeos 1-5), sugieren que las DC también juegan un papel activo en este proceso. Nuestras observaciones, también sugieren que la transfagocitosis puede darse desde DC muertas (vídeo 2) lo que podría tener un sentido biológico para tratar de detectar/eliminar las bacterias responsables de este daño. Por otra parte, la capacidad de otras células infectadas de “ceder” las bacterias a los linfocitos T CD4⁺ no está estudiada, y es una de las vías a explorar en el futuro cercano. Recientemente se ha publicado un mecanismo de captura de bacterias por macrófagos desde células epiteliales infectadas similar al que nosotros hemos descrito en este trabajo para los linfocitos, aunque el mecanismo propuesto es vía trogocitosis (Steele et al., 2016). Steele y colaboradores observan un paso de bacterias vivas desde células infectadas a macrófagos, y proponen que podría ser un método de diseminación de bacterias. Este proceso no se produce de unas células epiteliales a otras, sino entre células epiteliales y macrófagos. Es interesante, que, tal y como hemos observado nosotros, la captación de bacterias parece ser específica y no ocurre con objetos inertes (micro-esferas). Este trabajo indica que la transfagocitosis podría ser un mecanismo extendido como método de captura bacteriana por parte de células del sistema inmune y

muy probablemente se desarrolle mediante mecanismos dependientes de PRR.

Nuestros datos, por ejemplo, muestran la especificidad de los linfocitos T CD4⁺ por las bacterias durante la transfagocitosis, así como la capacidad de estas células por la captación de bacterias extracelulares (asociadas a las DC), sugieren que los PRR (TLR) juegan un papel relevante de en este proceso. Tanto los PAMPs bacterianos como las señales de peligro (Cao, 2016) de las células muertas (nótese que los linfocitos pueden capturar bacterias desde DC muertas) son detectados por los PRR. El papel de los PRR en la transfagocitosis es otra de las vías de trabajo que se abre gracias a este trabajo, y para la cual tendremos algunos datos en el futuro próximo, usando como base linfocitos de ratones MyD88 KO. MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) es una proteína cuya función es clave en la cascada de señalización de los TLRs (salvo de TLR3), su objetivo final es la activación de, entre otros, el factor de transcripción NF-κB, el cual modificará la expresión génica de la célula (Medzhitov et al., 1998; Takeuchi et al., 1999).

La transfagocitosis, se potencia por la presentación antigénica, aunque también se puede dar (en menor medida) en ausencia de activación del TCR. Este incremento de la transfagocitosis en presencia de estimulación antigénica, sin embargo, parece no tener que ver con una potenciación de los contactos celulares ya que usando anticuerpos aglutinantes no se observa este incremento en la captura de las bacterias por parte de los linfocitos. Es más probable que sea la señalización a partir de la estimulación del TCR la que facilite la captura bacteriana. Queda a su vez pendiente de estudio la existencia de diferencias en la capacidad presentadora de los linfocitos transfagocíticos dependientes de su activación vía TCR.

Sorprendentemente, los linfocitos T transfagocíticos eliminan de forma muy eficaz las bacterias que capturan, al menos las que hemos testado, certificando su capacidad de actuar como células del sistema inmune innato. Esto contrasta no solo con la visión clásica de la inmunología (nótese que son linfocitos T CD4⁺ convencionales), sino que además contrasta con los experimentos *in vivo* donde encuentran bac-

terias vivas dentro de linfocitos (McElroy et al., 2009; Salgado-Pabon et al., 2013). Esto último, aunque parece una contradicción con nuestros datos, es muy similar a lo observado con otras células fagocíticas profesionales, donde las bacterias no son eliminadas totalmente, y “utilizan” estos fagocitos para diseminarse por el organismo, como un caballo de Troya (Cossart, 2004; Guidi-Rontani, 2002).

La degradación de bacterias por parte de linfocitos T CD4⁺ convencionales nunca se había descrito. Esta degradación bacteriana es lisosomal, lo cual nos pareció extraño en un principio debido a que las bacterias analizadas, *Salmonella* y *Listeria*, poseen mecanismos para escapar de los lisosomas (Hashim et al., 2000; Shaughnessy et al., 2006). Esto indica que: o bien *Salmonella* no puede madurar el fagosoma de la misma forma a como lo hace en otros fagocitos (Steele-Mortimer O, 2008), y que *Listeria* es incapaz de escapar al citoplasma (Shaughnessy et al., 2006), o bien que, aunque ambos patógenos se comporten de forma similar, los linfocitos tengan mecanismos que compensen este escape lisosomal. Aunque este aspecto está aún sin resolver, respecto a *Listeria*, el hecho de que se vea rodeada de actina dentro del linfocito (Figura 4.3 C) indica que si puede escapar al citoplasma. En otras imágenes se ven las bacterias en proceso de degradación en lo que parecen ser vacuolas (Figura 4.3 D), incluso estando las bacterias rodeadas de actina, lo que nos indica que es posible que los mecanismos de autofagia (Kruppa et al., 2016; Torraca and Mostowy, 2016) puedan estar teniendo lugar para eliminar estas bacterias. Nótese que se conoce que *Listeria* puede marcarse con ubiquitina y degradarse por autofagia en otros tipos celulares (Ogawa et al., 2014).

Los péptidos de las bacterias degradadas son transportados al retículo endoplásmico por los transportadores TAP (TAP1 y TAP2), cargados en el MHC-I y presentados en superficie por los linfocitos trans-fagocíticos en el contexto del MHC-I. Existen algunos trabajos que muestran que los linfocitos humanos pueden presentar antígenos solubles vía MHC-II. Estos trabajos se ignoran por la comunidad científica, quizás porque no demostraron un papel fisiológico *in vivo* de dicha presentación, además los mismos autores, indicaron que el papel fisiológico de la presentación antigénica mediada por linfocitos T sería

irrelevante debido a que no son células fagocíticas (Lanzavecchia et al., 1988; Lanzavecchia and Sallusto, 1994). También existen trabajos que indican que los linfocitos convencionales vía trogocitosis son capaces de presentar antígenos, pero estos trabajos también adolecen de experimentos *in vivo* que indiquen que esta presentación antigénica pueda jugar algún papel fisiológico (Campana et al., 2015; Nakayama, 2014). Nosotros vamos mucho más allá, mostramos que los linfocitos convencionales son capaces de capturar, destruir bacterias y presentar (vía presentación cruzada clásica) antígenos bacterianos. Esta presentación es llevada a cabo por la maquinaria endógena de los linfocitos, y aunque observamos que puede darse presentación antigénica vía trogocitosis, ésta es residual si se compara con la presentación autónoma de los linfocitos (Figura 4.15). Además, mostramos un papel fisiológico relevante *in vivo*. La presentación antigénica mediada por linfocitos TCD4⁺tf es fundamental para la generación de células T CD8⁺ de memoria. En contra de lo que se creía hasta ahora, el papel de los linfocitos T CD4⁺ no consiste sólo en activar o “licenciar” las DC (por ejemplo, vía CD40-CD40L), sino que ellos mismos juegan un papel fundamental en la generación de esta memoria en los linfocitos T CD8⁺. Nuestros datos pues, expanden lo que se conoce sobre el papel de los linfocitos T CD4⁺ en la generación de células de memoria, un mecanismo fundamental de la respuesta inmune con repercusiones directas en biomedicina. Un estudio reciente mediante microscopía *in vivo* ha descrito la sucesión de eventos que tienen lugar en la activación de la respuesta mediada por linfocitos T CD8⁺. Este estudio concluye que la activación de linfocitos T CD8⁺ es precedida por la activación de linfocitos T CD4⁺ (Hor et al., 2015). En esta secuencia de activación primero se activan las DC que migran a los SLO, éstas activan a los linfocitos T CD4⁺ y tras esto se activan los linfocitos T CD8⁺, lo cual encaja perfectamente con lo que se propone en esta tesis doctoral. Otro evento de difícil explicación en la visión clásica de formación de células T CD8⁺ de memoria, es la aparición de conjugados entre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que se producen *in vivo*. Se ha propuesto la existencia de un subtipo de DC que propiciaría estos contactos, “a tres” DC/T CD4⁺/T CD8⁺ (Laidlaw et al., 2016), que sin embargo sigue sin explicar de forma satisfactoria los contactos T CD4⁺/T CD8⁺. En cambio, el modelo presentado en esta tesis, con los linfocitos T CD4⁺tf como células presentadoras encaja perfectamente tanto en la secuencia de activación (DC-T CD4⁺-T CD8⁺) como en la formación de conjugados T CD4⁺/T CD8⁺. Nótese que al menos *in vitro*, en ausencia de presentación antigénica, los conjugados T CD4⁺/TCD8⁺ son prácticamente inexistentes (Figura 4.12 E). El aumento de los contactos entre linfocitos

T CD4⁺ activados y linfocitos T CD8⁺, observados por Jyh Liang Hor y colaboradores, lo que ellos llaman “clustering”, entre células T CD4⁺ y T CD8⁺, encaja perfectamente con un modelo con linfocitos T CD4⁺ como células presentadoras y es difícilmente explicable con otro modelo. Nuestros datos, que expanden las funciones de los linfocitos T CD4⁺, explican los vacíos que se encuentran los modelos actuales de generación de células de memoria. Según nuestro modelo ambos tipos celulares, tanto DC como linfocitos T CD4⁺tf realizarían presentación antigénica cruzada a linfocitos T CD8⁺, pero, la presentación mediada por linfocitos T CD4⁺tf promueve la generación de células de memoria centrales, que además expresan mucho menos PD-1, que las generadas a partir de la activación vía DC (Figura 5.1).

Hemos realizado varios experimentos para determinar si los linfocitos CD4⁺tf son capaces de presentar antígenos vía MHC-II y no hemos tenido ningún resultado positivo (datos no mostrados). Esto no quiere decir que no sean capaces de hacerlo, sólo que en las condiciones experimentales usadas, y con *Listeria*-OVA como modelo, no se observa. Nótese que la cantidad de OVA que expresa *Listeria*-OVA, es muy baja, lo que indica la potencia de la presentación cruzada mediada por linfocitos CD4⁺tf, pero quizás no sea suficiente para observar una presentación vía MHC-II. Estamos trabajando para conseguir mayores niveles de expresión de OVA en *Listeria* y en *Salmonella* para corroborar esta hipótesis. Los linfocitos humanos activados son capaces de expresar MHC-II, sin embargo en ratón, hasta ahora, no se ha encontrado expresión de MHC-II por parte de los linfocitos.

El hecho de que los linfocitos puedan procesar y presentar antígenos cambiará la forma de ver la inmunidad adaptativa, haciendo que se difuminen aún más los límites artificiales entre la inmunidad innata y la adaptativa.

El hecho de que los linfocitos CD4⁺tf sean por una parte muy pro-inflamatorios (Figura 4.10), y además produzcan CTLs con poca expresión de PD-1 (Figura 4.20) nos hizo plantearnos su posible uso en inmunoterapias contra tumores. Se conoce desde hace tiempo que el sistema inmune puede afectar el

Figura 5.1

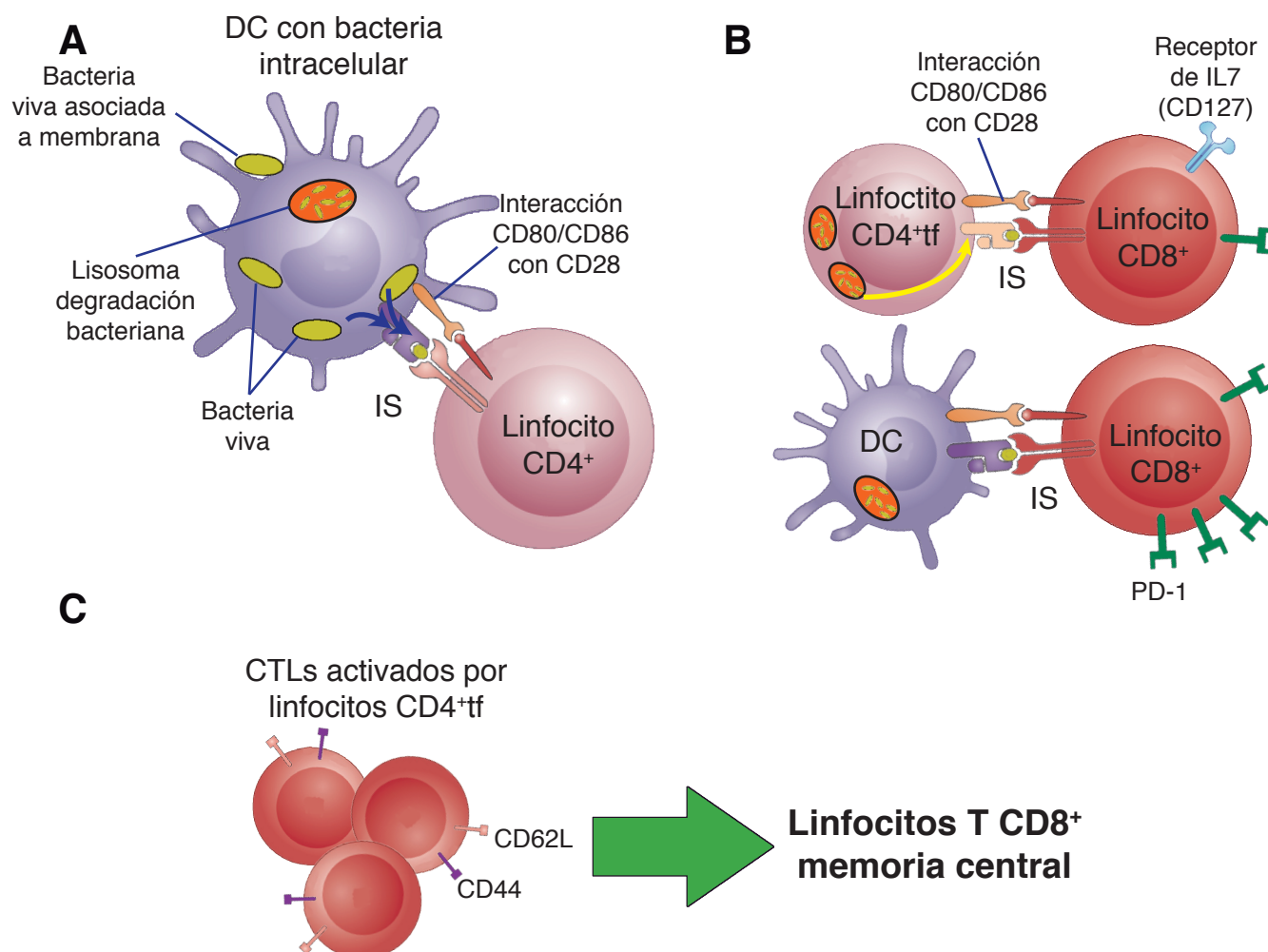


Figura 5.1 Modelo de activación de linfocitos T CD8⁺ mediante linfocitos T CD4⁺ transfangocíticos. El modelo que en esta tesis se propone rompe con el modelo clásico de infección y activación linfocitaria. En este modelo las células dendríticas son reclutadas en una fase temprana de la infección. Estas DC capturan bacterias, las cuales quedan arrestadas en el interior de algunas DC, que migran a los nódulos linfáticos cercanos. En los LN estas DC contienen bacterias degradadas y otras vivas en su interior, con lo que podrían establecer contactos con los linfocitos T CD4⁺ hasta formar una IS con el linfocito T CD4⁺ que reconozca los antígenos bacterianos (**A**). Esta IS sería el medio por el cual la DC logra pasar, mediante lo que hemos llamado transfangocitosis, algunas bacterias vivas a los linfocitos T CD4⁺ transfangocíticos. Estos linfocitos degradan la bacteria en su interior y son capaces de presentar esos antígenos bacterianos en el contexto de su MHC-I, con lo que en este LN tendríamos dos activaciones paralelas de linfocitos T CD8⁺, la llevada a cabo por DC y las que realizan los linfocitos T CD4⁺ transfangocíticos (**B**). Tras la fase de expansión de los linfocitos citotóxicos, los linfocitos activados por las DC sufren un proceso de senescencia y extenuación caracterizado por marcadores como PD-1, mientras que los activados por linfocitos T CD4⁺ transfangocíticos son seleccionados para formar parte de los conocidos linfocitos T CD8⁺ memoria central (**C**).

desarrollo de ciertos tipos de cáncer. La terapia anti-tumoral basada en la inyección de células aisladas de los nódulos linfáticos (transferencia adoptiva celular) fue publicada por primera vez hace más de 50

años en modelos de ratón (Mitchison N. A., 1955; Mitchison N. A. and Dube O. L. 1955). Incluso antes de que el sistema inmune se comprendiese bien, a finales del siglo XIX, el Dr. William Coley, entre otros, se dió cuenta de que pacientes con tumores que sufrían infecciones bacterianas (en concreto una enfermedad de la piel conocida como erisipelas) eran capaces de eliminar los tumores (Coley, 1893; 1910). Incluso hoy en día, es conocido por los clínicos que infecciones post-operatorias pueden resultar en una mejor prognosis de pacientes operados de tumores sólidos. Recientemente, un ensayo clínico en fase 1 analizó el efecto de las «toxinas inactivadas Coley» (*Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*) y mostró que el incremento de citoquinas pro-inflamatorias que se producen durante el tratamiento podría ser el responsable de las remisiones de los tumores (Karbach et al., 2012). La inducción de la inmunidad anti-tumoral sistémica requiere la activación de las células T CD8⁺, ya sea de forma directa por presentación antigénica de péptidos tumorales o indirecta vía infecciones bacterianas.

Más allá de las formas clásicas de tratamientos tumorales tales como la radioterapia, quimioterapia, recientemente han surgido terapias antitumorales basadas en la estimulación del sistema inmune que han posibilitado el tratamiento de ciertos tumores con muy mal pronóstico (Chen and Mellman, 2013b; Eggermont et al., 2014). La mayoría de estos tratamientos están dirigidos a potenciar la actividad citotóxica de los linfocitos efectores T CD8⁺, bien mediante el uso de anticuerpos bloqueantes de los conocidos como *check points*, responsables de la inhibición linfocitaria que se produce en el ambiente inmunosupresor que generan los tumores (anti PD-1, PD-1L y CTLA-4 entre otros)(Wolchok, J. D. & Chan, T. A. 2014), bien por terapias que implican la transferencia adoptiva de leucocitos (Galluzzi et al., 2016), bien generando linfocitos T CD8⁺ con sus TCR modificados para reconocer antígenos tumorales (CAR-T) (Kochenderfer et al., 2010; Kochenderfer and Rosenberg, 2013).

Las terapias basadas en transferencia adoptiva de leucocitos están apoyadas en resultados de ensayos clínicos donde se aprecian las propiedades anti-tumorales de las DC (Restifo et al., 2012), y de las células T aisladas de los tumores, los conocidos como TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) (Coulie et

al., 2014). Las DC, que estaban consideradas hasta ahora las mejores células presentadoras de antígenos, deben capturar, procesar y presentar los antígenos tumorales en sus MHC-I para activar las células T CD8⁺ que son las que finalmente eliminarán las células malignas (Fehres et al., 2014a; Fehres et al., 2014b). De hecho, las DC se han utilizado como vacuna contra ciertos tipos de cáncer ya que son capaces de generar respuesta inmune anti-tumoral in vivo (Cavallo et al., 2006; Gardner and Ruffell, 2016). Sin embargo, un obstáculo importante para la inmunoterapia tumoral reside en la naturaleza inmunosupresora de los tumores sólidos; la mayoría de las células tumorales y sus antígenos asociados están situados en un entorno inmunosupresor, impidiendo a diferentes niveles de la activación apropiada de las células T CD8⁺ (Chen and Mellman, 2013b). Entre los tratamientos para evadir este ambiente inmunosupresor, además del uso de anticuerpos para evitar la inhibición anteriormente descritos (como anti PD1), también se está ensayando con la liberación localizada de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ , que promueven la actividad de los macrófagos anti-tumorales (Noy and Pollard, 2014).

Y, aunque para los oncólogos estas inmunoterapias suponen una revolución, la baja tasa de respuesta y la supervivencia que raramente se extiende más allá de unos meses en algunos tipos de tumores, hace necesaria la aparición de nuevas herramientas que mejoren la respuesta inmune frente a los tumores, y extienda al máximo la supervivencia de los pacientes, idealmente llegando a la remisión total y permanente.

El sistema de linfocitos T CD4⁺tf que presentamos en esta tesis ofrece una serie de ventajas sobre las terapias ya existentes: son muy pro-inflamatorios (secretan grandes cantidades de IFN- γ y TNF- α) de forma localizada, además estimulan de forma muy potente a las células T CD8⁺ que por otra parte se convierten en células de memoria con poca expresión de PD-1. Estas características, que las hacen idóneas para tratamientos antitumorales, se han probado en un modelo de melanoma agresivo de ratón con resultados sorprendentes, donde una sola dosis de linfocitos CD4⁺tf que capturaron bacterias que expresaban un antígeno tumoral fue suficiente para impedir el desarrollo de los tumores en el 70% de

los animales incluidos en el estudio (frente al 0% de protección en los controles).

Finalmente el sistema de tratamiento con linfocitos T CD4⁺tf presenta una clara ventaja práctica: la bacteria. Las bacterias usadas en la transfagocitosis pueden ser modificadas para expresar cualquier antígeno. Esto unido al avance constante en el campo de la identificación de antígenos tumorales (Schumacher and Schreiber, 2015). Hacen que el modelo aquí propuesto tenga un gran potencial como nueva generación de inmunoterapia contra el cáncer.

También se podría analizar en un futuro si los linfocitos T CD4⁺tf podrían proteger de infecciones bacterianas, como una alternativa a los antibióticos. Este punto tiene una gran relevancia, dado que la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en una amenaza cada vez más grave para la salud pública mundial, según la organización mundial de la salud (WHO). Los linfocitos T CD4⁺tf secretan grandes cantidades de IL-6, interferón- γ y TNF- α , y protegen *in vivo* de infecciones de *L. Monocytogenes* (Figura 4.10 y 4.11). Queda pendiente pues testar si los linfocitos T CD4⁺tf podrían proteger de otras infecciones bacterianas (incluyendo cepas de *Mycobacterium*).

Conclusiones

Conclusiones

1. Los linfocitos T CD4⁺ convencionales no son capaces de capturar bacterias cuando se exponen a ellas de manera directa.
2. Los linfocitos T CD4⁺ convencionales son capaces de capturar bacterias desde DCs infectadas mediante transfagocitosis.
3. La transfagocitosis es un proceso que depende del citoesqueleto del linfocito T CD4⁺, necesita un contacto célula-célula, es potenciada por el reconocimiento antigénico y no depende de la patogenicidad de las bacterias.
4. Los linfocitos T CD4⁺ eliminan las bacterias transfagocitadas, y esta degradación es llevada a cabo, al menos parcialmente, por vía lisosomal.
5. Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian a células muy proinflamatorias, secretando grandes cantidades de IFN- γ TNF- α e IL-6, y responden de forma rápida a infecciones por *L. monocytogenes*, mimetizando la respuesta inmune innata.
6. Los linfocitos T CD4⁺ expresan moléculas co-estimuladoras (CD86), aumenta su expresión de MHC-I y son capaces de procesar las bacterias que capturan y presentar los antígenos bacterianos a linfocitos T CD8⁺ vírgenes. El procesamiento antigénico es llevado a cabo por los propios linfocitos T CD4⁺, que cargan los antígenos en sus MHC-I. Existe presentación antigénica en MHC capturados de la DC por trogocitosis, pero ésta es residual.

7. Los péptidos de las bacterias degradadas por los linfocitos T CD4⁺tf son procesados para su presentación cruzada, al menos en parte, por la vía clásica de TAP1.
8. Los linfocitos T CD8⁺ activados por los linfocitos T CD4⁺tf son completamente funcionales como CTLs.
9. Los linfocitos T CD4⁺tf tienen un papel clave en la creación de la memoria TCM y de una respuesta citotóxica activa con bajos niveles de expresión de PD-1. Este papel, no está limitado a activar las DC, sino que la presentación antigénica de los linfocitos T CD4⁺tf a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes es, en gran parte, la responsable de que éstos se diferencien a células de memoria central.
10. Los linfocitos T CD4⁺tf representan una prometedora y potencial herramienta para combatir diferentes tipos de cáncer tal y como revela la prueba de concepto llevada a cabo con un modelo de melanoma agresivo de ratón.

Bibliografía

- Abbas, A.K. (1996). Die and Let Live: Minireview Eliminating Dangerous Lymphocytes. *Cell* 1–3, Volume 84, Issue 5, p655–657, 8 March 1996.
- Abbas, A.K., Sher, A., and Murphy, K.M. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.
- Abbas, Lichtman & Pillai. *Immunología celular y molecular*. Editorial Elsevier, 8ª edición 2015.
- Abdullah, Z., and Knolle, P.A. (2014). Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. *The EMBO Journal* 33, 2283–2294.
- Ahmed, K.A., Xie, Y., and Xiang, J. (2009). Acquired pMHC I complexes greatly enhance CD4(+) Th cell's stimulatory effect on CD8(+) T cell-mediated diabetes in transgenic RIP-mOVA mice. *Cell Mol Immunol*. 2009 Dec;5(6):407-15.
- Alarcón, B., Mestre, D., and Martínez-Martín, N. (2011). The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 133, 420–425.
- Alloatti A., Kotsias F., Magalhaes J. G., Amigorena S. (2016). Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters. *Immunol Rev*. 2016 Jul;272(1):97-108. doi: 10.1111/imr.12432.
- Arts, B.J.W., and Netea, M.G. (2016). Adaptive Characteristics of Innate Immune Responses in Macrophages. *Microbiol Spectr*. 2016 Aug;4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0023-2015.
- Arts, R.J.W., Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2016). Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin Immunol*. 2016 Oct;28(5):425-430. doi: 10.1016/j.smim.2016.09.002.
- Bachmann, M.F, Wolint, P., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2005a). Recall Proliferation Potential of Memory CD8+ T Cells and Antiviral Protection. *The Journal of Immunology* 175, 4677–4685.
- Bachmann, M.F, Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., and Oxenius, A. (2005b). Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *The Journal of Immunology* 175, 4686–4696.

Balestrino, D., Hamon, M.A., Dortet, L., Nahori, M.A., Pizarro-Cerda, J., Alignani, D., Dussurget, O., Cossart, P., and Toledo-Arana, A. (2010). Single-Cell Techniques Using Chromosomally Tagged Fluorescent Bacteria To Study *Listeria monocytogenes* Infection Processes. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3625–3636.

Banchereau J., Steinman R. M.(1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52. DOI: 10.1038/32588

Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296–306.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2005). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.

Barnaba V, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A. (1994). Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol*. 1994 Jan;24(1):71-5.

Barnden M. J., Allison J., Heath W. R., Carbone F. R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol*. 1998 Feb;76(1):34-40.

Batista F. D. and Harwood N. E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan;9(1):15-27. doi: 10.1038/nri2454.

Batista F. D. and Saito T. (2010) The immunological synapse enter its second decade... *Curr Top Microbiol Immunol*.

Bedoui, S., Mueller, S.N., and Heath, W.R. (2016). T-cell help amplifies innate signals for primary CD8. *Immunol Rev*. 2016 Jul;272(1):52-64. doi: 10.1111/imr.12426.

Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488–495.

- Bennett S. R., Carbone F. R., Karamalis F., Flavell R. A., Miller J. F., Heath W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 1998 Jun 4;393(6684):478-80.
- Benvenuti, F. (2016). The Dendritic Cell Synapse: A Life Dedicated to T Cell Activation. *Front. Immunol.* 7, 56–56.
- Berke, G. (1995a). The CTL's Kiss of Death. *Cell*. 1995 Apr 7;81(1):9-12.
- Berke, G. (1995b). PELs and the Perforin and Granzyme Independent Mechanism of CTL- mediated Lysis. *Immunol Rev*. 1995 Aug;146:21-31.
- Bird, P.I., Trapani, J.A., and Villadangos, J.A. (2009). Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nat Rev Immunol* 9, 871–882.
- Bjorkdahl, O., Barber, K.A., Brett, S.J., Tite, J., and Thomsen, L.L. (2003). Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues. *Immunology*. 2003 Oct;110(2):170-9.
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H.C., Blum, H.E., and Thimme, R. (2006). Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8+ T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology* 80, 3532–3540.
- Borg, N.A., Wun, K.S., Kjer-Nielsen, L., Wilce, M.C.J., Pellicci, D.G., Koh, R., Besra, G.S., Bharadwaj, M., Godfrey, D.I., McCluskey, J., et al. (2007). CD1d–lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* 448, 44–49.
- Borroto, A., Arellano, I., Blanco, R., Fuentes, M., Orfao, A., Dopfer, E.P., Prouza, M., Suchanek, M., Schamel, W.W., and Alarcon, B. (2014). Relevance of Nck-CD3 Interaction for T Cell Activation In Vivo. *The Journal of Immunology* 192, 2042–2053.
- Brockstedt D. G, Giedlin M. A., Leong M. L., Bahjat K. S., Gao Y., Luckett W., Liu W., Cook D. N., Portnoy D. A., Dubensky T. W. Jr.(2004). Listeria-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 21;101(38):13832-7.

Brunkow M. E., Jeffery E. W., Hjerrild K. A., Paepers B., Clark L. B., Yasayko S. A., Wilkinson J. E., Galas D., Ziegler S. F., Ramsdell F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):68-73.

Buchmeier, N.A., and Schreiber, R.D. (1985). Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Nov;82(21):7404-8.

Calabia-Linares, C., Robles-Valero, J., la Fuente, de, H., Perez-Martinez, M., Martin-Cofreces, N., Alfonso-Perez, M., Gutierrez-Vazquez, C., Mittelbrunn, M., Ibiza, S., Urbano-Olmos, F.R., et al. (2011). Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *Journal of Cell Science* 124, 820–830.

Campana, S., De Pasquale, C., Carrega, P., Ferlazzo, G., and Bonaccorsi, I. (2015). Cross-dressing: an alternative mechanism for antigen presentation. *Immunol Lett.* 2015 Dec;168(2):349-54. doi: 10.1016/j.imlet.2015.11.002.

Cao, X. (2016). Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat Rev Immunol* 16, 35–50.

Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1989). Induction of ovalbumin-specific cytotoxic T cells by in vivo peptide immunization. *J Exp Med.* 1989 Mar 1;169(3):603-12.

Cavallo, F., Offringa, R., van der Burg, S.H., Forni, G., and Melief, C.J.M. (2006). Vaccination for treatment and prevention of cancer in animal models. *Adv Immunol.* 2006;90:175-213. (Elsevier).

Chapuis A. G., Thompson J. A., Margolin K. A., Rodmyre R., Lai I. P., Dowdy K., Farrar E. A., Bhatia S., Sabath D. E., Cao J., Li Y., Yee C. (2012). Transferred melanoma-specific CD8⁺ T cells persist, mediate tumor regression, and acquire central memory phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 20;109(12):4592-7. doi: 10.1073/pnas.1113748109.

Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004). Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6076–6085.

- Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1–10.
- Chiappi, M., Conesa, J.J., Pereiro, E., Sorzano, C.O.S., Rodríguez, M.J., Henzler, K., Schneider, G., Chichón, F.J., and Carrascosa, J.L. (2016). Cryo-soft X-ray tomography as a quantitative three-dimensional tool to model nanoparticle:cell interaction. *J Nanobiotechnology*. 2016 Mar 3;14:15. doi: 10.1186/s12951-016-0170-4.
- Chichon, F.J., Rodríguez, M.J., Pereiro, E., Chiappi, M., Perdiguero, B., Guttman, P., Werner, S., Rehbein, S., Schneider, G., Esteban, M., et al. (2012). Cryo X-ray nano-tomography of vaccinia virus infected cells. *Journal of Structural Biology* 177, 202–211.
- Choi W. S., Yoon S. Y., Oh T. H., Choi E. J., O'Malley K. L., Oh Y. J.(1999). Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res*. 1999 Jul 1;57(1):86-94.
- Coley, W.B. (1893). Hawkins on tubercular peritonitis. *Ann Surg*. 1893 Apr;17(4):462-4.
- Coley, W.B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*. 1910;3(Surg Sect):1-48.
- Colluru, V.T., and McNeel, D.G. (2016). B lymphocytes as direct antigen-presenting cells for anti-tumor DNA vaccines. *Oncotarget*. 2016 Oct 18;7(42):67901-67918. doi: 10.18632/oncotarget.12178.
- Karrer U., Althage A., Odermatt B., Roberts C. W., Korsmeyer S. J., Miyawaki S., Hengartner H., Zinkernagel R. M. (1997). On the Key Role of Secondary Lymphoid Organs in Antiviral Immune Responses Studied in A lymphoplastic (aly/aly) and Spleenless (Hox11-/-) Mutant Mice. *J Exp Med*. 1997 Jun 16;185(12):2157-70.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 1996;173(1 Spec No):33-8.
- Cossart, P. (2004). Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science* 304, 242–248.

- Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014 Feb;14(2):135-46. doi: 10.1038/nrc3670.
- Cruz-Adalia, A., and Veiga, E. (2016). Close Encounters of Lymphoid Cells and Bacteria. *Front. Immunol.* 7, 866–15.
- Delamarre, L. (2005). Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science* 307, 1630–1634.
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., et al. (2007). Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo. *Science* 315, 107–111.
- Dustin, M.L. (2014). The Immunological Synapse. *Cancer Immunology Research* 2, 1023–1033.
- D’Errico, G., Machado, H.L., and Sainz, B. (2016). A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med*. 2017 Dec;6(1):3. doi: 10.1186/s40169-016-0130-5.
- Eggermont, L.J., Paulis, L.E., Tel, J., and Figdor, C.G. (2014). Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends in Biotechnology* 32, 456–465.
- Fehres, C.M., Bruijns, S.C.M., van Beelen, A.J., Kalay, H., Ambrosini, M., Hooijberg, E., Unger, W.W.J., de Gruijl, T.D., and van Kooyk, Y. (2014a). Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8 +T-cell cross-priming. *Eur J Immunol*. 2014 Aug;44(8):2415-24. doi: 10.1002/eji.201344094.
- Fehres C. M., Unger W. W., Garcia-Vallejo J. J., van Kooyk Y. (2014b). Understanding the biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Front Immunol*. 2014 Apr 8;5:149. doi: 10.3389/fimmu.2014.00149.
- Filby, A., Begum, J., Jalal, M., and Day, W. (2015). Appraising the suitability of succinimidyl and lipophilic

fluorescent dyes to track proliferation in non-quiescent cells by dye dilution. *Methods*. 2015 Jul 1;82:29-37. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.02.016.

Galluzzi L., Zitvogel L., Kroemer G. (2016). Immunological Mechanisms Underneath the Efficacy of Cancer Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2016 Nov;4(11):895-902. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0197

Gannon P. O., Baumgaertner P., Huber A., Iancu E. M., Cagnon L., Abed Maillard S., Maby-El Hajjami H., Speiser D. E., Rufer N. (2016). Rapid and continued T cell differentiation into long-term effector and memory stem cells in vaccinated melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2016 Nov 21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1708.

Gapin, L. (2016). ScienceDirect Development of invariant natural killer T cells. *Current Opinion in Immunology* 39, 68–74.

Gardner, A., and Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol*. 2016 Dec;37(12):855-865. doi: 10.1016/j.it.2016.09.006.

Garvey E. P., Oplinger J. A., Furfine E. S., Kiff R. J., Laszlo F., Whittle B. J., Knowles R. G.(1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1997 Feb 21;272(8):4959-63.

Geijtenbeek T. B., Kwon D. S., Torensma R., van Vliet S. J., van Duijnhoven G. C., Middel J., Cornelissen I. L., Nottet H. S., KewalRamani V. N., Littman D. R., Figdor C. G., van Kooyk Y.(2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances. *Cell*. 2000 Mar 3;100(5):587-97.

Gregory, S.H., and Liu, C.-C. (2000). CD8 T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol Rev*. 2000 Apr;174:112-22.

Gross, F., Lazar, J., and Orth, H. (1972). Inhibition of the Renin-Angiotensinogen Reaction by Pepstatin. *Science*. 1972 Feb 11;175(4022):656.

Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J. E., Roncarolo M. G.(1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct

16;389(6652):737-42.

Guidi-Rontani, C. (2002). The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol.* 2002 Sep;10(9):405-9.

Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., Mittelbrunn, M., and Villarroya-Beltri, C. (2012). Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev.* 2013 Jan;251(1):125-42. doi: 10.1111/imr.12013.

Haan, den, J.M.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8^+ but Not Cd8^- Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685–1696.

Hamilton, S.E., Tvinnereim, A.R., and Harty, J.T. (2001). *Listeria monocytogenes* Infection Overcomes the Requirement for CD40 Ligand in Exogenous Antigen Presentation to CD8^+ T Cells. *The Journal of Immunology* 167, 5603–5609.

Hanssen, E., Goldie, K.N., and Tilley, L. (2010). Ultrastructure of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Methods Cell Biol.* 2010;96:93-116. doi: 10.1016/S0091-679X(10)96005-6.

Hanssen, E., Knoechel, C., Klonis, N., Abu-Bakar, N., Deed, S., LeGros, M., Larabell, C., and Tilley, L. (2011). Cryo transmission X-ray imaging of the malaria parasite, *P. falciparum*. *Journal of Structural Biology* 173, 161–168.

Hart, P.D., and Young, M.R. (1991). Ammonium Chloride, an Inhibitor of Phagosome- Lysosome Fusion in Macrophages, Concurrently Induces Phagosome-Endosome Fusion, and Opens a Novel Pathway: Studies of a Pathogenic Mycobacterium and a Nonpathogenic Yeast. *J Exp Med.* 1991 Oct 1;174(4):881-9.

Hashim, S., Mukhopadhyay, A., and Mukherjee, K. (2000). Live *Salmonella* Modulate Expression of Rab Proteins to Persist in a Specialized Compartment and Escape Transport to Lysosomes. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):16281-8.

Hill, M., Tanguy-Royer, S., Royer, P., Chauveau, C., Asghar, K., Tesson, L., Lavainne, F., Rémy, S., Brion, R., Hubert, F.-X., et al. (2007). IDO expands human $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ regulatory T cells by promoting maturation

of LPS-treated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3054–3062.

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1994). T Cell Receptor Antagonist Peptides Induce Positive Selection. *Cell*. 1994 Jan 14;76(1):17-27.

Hor, J.L., Whitney, P.G., Zaid, A., Brooks, A.G., Heath, W.R., and Mueller, S.N. (2015). Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4+ and CD8+ T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity* 43, 554–565.

Huppa J. B. and Davis M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*. Dec 3(12):973-83.

Huster K. M., Busch V., Schiemann M., Linkemann K., Kerksiek K. M., Wagner H., Busch D. H. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13;101(15):5610-5.

Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M.(1992). Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor. *J Exp Med*. 1992 Dec 1;176(6):1693-702.

Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gómez, M., Erkizia, I., Puertas, M.C., Borràs, F.E., Blanco, J., and Martinez-Picado, J. (2010). HIV and Mature Dendritic Cells: Trojan Exosomes Riding the Trojan Horse? *PLoS Pathog*. 2010 Mar 26;6(3):e1000740. doi: 10.1371/journal.ppat.1000740.

Janssen E. M., Lemmens E. E., Wolfe T., Christen U., von Herrath M. G., Schoenberger S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 2003 Feb 20;421(6925):852-6.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jul 13;12(8):557-69. doi: 10.1038/nri3254.

John J. O'Shea and William E. Paul (2010). Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1098-102. doi: 10.1126/science.1178334.

- Kallies, A. (2008). Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 86, 325–332.
- Karbach, J., Neumann, A., Brand, K., Wahle, C., Siegel, E., Maeurer, M., Ritter, E., Tsuji, T., Gnjatic, S., Old, L.J., et al. (2012). Phase I clinical trial of mixed bacterial vaccine (Coley's toxins) in patients with NY-ESO-1 expressing cancers: immunological effects and clinical activity. *Clinical Cancer Research* 18, 5449–5459.
- Karrich, J.J., Jachimowski, L.C.M., Nagasawa, M., Kamp, A., Balzarolo, M., Wolkers, M.C., Uittenbogaart, C.H., Marieke van Ham, S., and Blom, B. (2013). IL-21-stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete granzyme B, which impairs their capacity to induce T-cell proliferation. *Blood* 121, 3103–3111.
- Kaye, J., and Ellenberger, D.L. (1992). Differentiation of an Immature T Cell Line: A Model of Thymic Positive Selection. *Cell*. 1992 Oct 30;71(3):423-35.
- Khan, S.H., and Badovinac, V.P. (2015). *Listeria monocytogenes*: a model pathogen to study antigen-specific memory CD8 T cell responses. *Semin Immunopathol*. 2015 May;37(3):301-10. doi: 10.1007/s00281-015-0477-5.
- Kharitonenko, K.V., Bedoshvili, Y.D., and Likhoshway, Y.V. (2015). Changes in the micro- and nanostructure of siliceous valves in the diatom *Synedra acus* under the effect of colchicine treatment at different stages of the cell cycle. *Journal of Structural Biology* 190, 73–80.
- Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev*. 2006 Jun;211:214-24.
- Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.A.N., Lanier, B.J., et al. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116, 4099–4102.
- Kochenderfer, J.N., and Rosenberg, S.A. (2013). Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Publishing Group* 10, 267–276.

- Kronenberg M., Siu G., Hood L. E., Shastri N. (1986). The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:529-91.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., and Sela, S. (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6076–6086.
- Kruppa, A.J., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2016). Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic* 17, 878–890.
- Kurioka, A., Ussher, J.E., Cosgrove, C., Clough, C., Fergusson, J.R., Smith, K., Kang, Y.-H., Walker, L.J., Hansen, T.H., Willberg, C.B., et al. (2014). MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol.* 2015 Mar;8(2):429-40. doi: 10.1038/mi.2014.81.
- Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):102-11. doi: 10.1038/nri.2015.10.
- Lang, T.J., Nguyen, P., Peach, R., Gause, W.C., and Via, C.S. (2002). In Vivo CD86 Blockade Inhibits CD4+ T Cell Activation, Whereas CD80 Blockade Potentiates CD8+ T Cell Activation and CTL Effector Function. *The Journal of Immunology* 168, 3786–3792.
- Lanier, L.L. (2013). Shades of grey — the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Feb;13(2):73-4. doi: 10.1038/nri3389.
- Lanzavecchia A., Roosnek E., Gregory T., Berman P., Abrignani S. (1988). T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature.* 1988 Aug 11;334(6182):530-2.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1109-18.
- Lara-Tejero, M. (2004). T cell responses to *Listeria monocytogenes*. *Current Opinion in Microbiology* 7, 45–50.

- Lauvau, G., Boutet, M., Williams, T.M., Chin, S.S., and Chorro, L. (2016). Memory CD8+ T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends in Immunology* 37, 375–385.
- Lázaro, S., Gamarra, D., and Del Val, M. (2015). Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome. *Mol Immunol.* 2015 Dec;68(2 Pt A):72-6. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.014..
- Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Coré, M., Sleurs, D., Serriari, N.-E., Treiner, E., et al. (2013). MAIT Cells Detect and Efficiently Lyse Bacterially-Infected Epithelial Cells. *PLoS Pathog* 9, e1003681–12.
- Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2010). Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. *Cell* 140, 845–858.
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* 31, 787–798.
- Martín-Cófreces, N.B., Baixauli, F., and Sánchez-Madrid, F. (2014). Immune synapse: conductor of orchestrated organelle movement. *Trends in Cell Biology* 24, 61–72.
- Mayordomo J. I., Zorina T., Storkus W. J., Zitvogel L., Celluzzi C., Falo L. D., Melief C. J., Ildstad S. T., Kast W. M., Deleo A. B. (2005). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med.* 1995 Dec;1(12):1297-302.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Lenoy, E., and Schneewind, O. (2000). *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5510-5.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):760-3.
- McElroy, D.S., Ashley, T.J., and D’Orazio, S.E.F. (2009). Lymphocytes serve as a reservoir for *Listeria* mo-

nocytogenes growth during infection of mice. *Microbial Pathogenesis* 46, 214–221.

McKinney, E.F., and Smith, K.G. (2016). ScienceDirect T cell exhaustion and immune-mediated disease — the potential for therapeutic exhaustion. *Current Opinion in Immunology* 43, 74–80.

McLachlan, J.B., Catron, D.M., Moon, J.J., and Jenkins, M.K. (2009). Dendritic Cell Antigen Presentation Drives Simultaneous Cytokine Production by Effector and Regulatory T Cells in Inflamed Skin. *Immunity* 30, 277–288.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C. A. Jr. (1998). MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):253-8.

Mitchison, N. A.(1955). Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer. *J Exp Med*. 1955 Aug 1;102(2):157-77.

Mitchison, N. A. and Dube O. L. (1955). Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. II. The relation between hemagglutinating antibody and graft resistance in the normal mouse and mice pretreated with tissue preparations. *J Exp Med*. 1955 Aug 1;102(2):179-97.

Mittelbrunn, M., Vicente-Manzanares, M., and Sánchez-Madrid, F. (2015). Organizing Polarized Delivery of Exosomes at Synapses. *Traffic* 16, 327–337.

Mombaerts P, Iacomini J, Johnson R. S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992 Mar 6;68(5):869-77.

Montfort, M.J., Bouwer, H.G.A., Wagner, C.R., and Hinrichs, D.J. (2004). The Development of Functional CD8 T Cell Memory after *Listeria monocytogenes* Infection Is Not Dependent on CD40. *The Journal of Immunology* 173, 4084–4090.

Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J.A., Apgar, J., Wilson, J., Lowe, L., Chen, R., Shivraj, L., Agadir, A., et al. (2004). Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas

of biology. *Clinical Immunology* 110, 252–266.

Nakayama, M. (2014). Antigen presentation by MHC-dressed cells. *Front Immunol.* 2015 Jan 5;5:672. doi: 10.3389/fimmu.2014.00672.

Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K., and Messaoudi, I. (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol.* 2004 Feb;4(2):123-32.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 41, 49–61.

Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Hain, T., Chakraborty, T., and Sasakawa, C. (2014). Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. *Autophagy* 7, 310–314.

O'Mahony L., Holland J., Jackson J., Feighery C., Hennessy T. P., Mealy K. (1998). Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol.* 1998 Aug;113(2):213-9.

Ornelles D. A., Fey E. G., Penman S. (1986). Cytochalasin Releases mRNA from the Cytoskeletal Framework and Inhibits Protein Synthesis. *Mol Cell Biol.* 1986 May;6(5):1650-62.

Page, D.M., Roberts, E.M., and Hedrick, S.M. (1997). TNF Receptor-Deficient Mice Reveal Striking Differences Between Several Models of Thymocyte Negative Selection. *J Immunol.* 1998 Jan 1;160(1):120-33.

Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., and Tosetto, A. (2015). Celastrol ameliorates Cd-induced neuronal apoptosis by targeting NOX2-derived ROS-dependent PP5-JNK signaling pathway. *Journal of Neurochemistry* 38, 42–49.

Pauken, K.E., and Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 2015 Apr;36(4):265-76. doi: 10.1016/j.it.2015.02.008.

Pereiro, E., Nicolas, J., Ferrer, S., and Howells, M.R. (2009). A soft X-ray beamline for transmission X-ray microscopy at ALBA. *J Synchrotron Radiat.* 2009 Jul;16(Pt 4):505-12. doi: 10.1107/S0909049509019396.

- Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P. *Listeria monocytogenes: techniques to analyze bacterial infection in vitro*. G. Kreitzer, J. Fanny, C. Espenel (Eds.) *Cell Biology Assays: Essential Methods*. Elsevier, New York; 2010: 261–272
- Raghavan, M., Del Cid, N., Rizvi, S.M., and Peters, L.R. (2008). MHC class I assembly: out and about. *Trends in Immunology* 29, 436–443.
- Ramirez-Santiago, G., Robles-Valero, J., Morlino, G., Cruz-Adalia, A., Pérez-Martínez, M., Zaldivar, A., Torres-Torresano, M., Chichón, F.J., Sorrentino, A., Pereiro, E., et al. (2016). Clathrin regulates lymphocyte migration by driving actin accumulation at the cellular leading edge. *Eur. J. Immunol.* 46, 2376–2387.
- Reeves, E., and James, E. (2016). Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology* 150, 16–24.
- Reiser, J., and Banerjee, A. (2016). Effector, Memory, and Dysfunctional CD8 +T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J Immunol Res.* 2016;2016:8941260. doi: 10.1155/2016/8941260.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 22;12(4):269-81. doi: 10.1038/nri3191.
- Romi, B., Soldaini, E., Pancotto, L., Castellino, F., Del Giudice, G., and Schiavetti, F. (2011). *Helicobacter pylori* Induces Activation of Human Peripheral $\gamma\delta$ + T Lymphocytes. *PLoS ONE* 6, e19324–e19329.
- Sabado, R.L., Balan, S., and Bhardwaj, N. (2016). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):74-95. doi: 10.1038/cr.2016.157.
- Salgado-Pabón W., Celli S., Arena E. T., Nothelfer K., Roux P., Sellge G., Frigimelica E., Bousso P., Sansonetti P. J., Phalipon A.(2013). *Shigella* impairs T lymphocyte dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 19;110(12):4458-63. doi: 10.1073/pnas.1300981110.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763.

Sanchez-Mateos, P., del Pozo, M.A., and Sánchez-Madrid, F. (1995). Regulatory Role of CD43 Leukosialin on Integrin-Mediated T-cell Adhesion to Endothelial and Extracellular Matrix Ligands and Its Polar Redistribution to a Cellular Uropod. *Blood*. 1995 Sep 15;86(6):2228-39.

Sansonetti P. J., Ryter A., Clerc P., Maurelli A. T., Mounier J. (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa Cells: Lysis of the Phagocytic Vacuole and Plasmid-Mediated Contact Hemolysis. *Infect Immun*. 1986 Feb;51(2):461-9.

Sánchez-Madrid, F., Springer, T.A., Nagy, J.A., Robbins, E., and Simon, P. (1983). A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med*. 1983 Dec 1;158(6):1785-1803.

Schneider, G., Guttman, P., Rehbein, S., Werner, S., and Follath, R. (2012). Cryo X-ray microscope with flat sample geometry for correlative fluorescence and nanoscale tomographic imaging. *Journal of Structural Biology* 177, 212–223.

Schoenberger, S.P., Toes, R.E.M., Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature*. 1998 Jun 4;393(6684):480-3.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):69-74. doi: 10.1126/science.aaa4971.

Serrador J. M., Nieto M., Alonso-Lebrero J. L., del Pozo M. A., Calvo J., Furthmayr H., Schwartz-Albiez R., Lozano F, González-Amaro R., Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F.(1998). CD43 Interacts With Moesin and Ezrin and Regulates Its Redistribution to the Uropods of T Lymphocytes at the Cell-Cell Contacts. *Blood*. 1998 Jun 15;91(12):4632-44.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707–723.

Shaughnessy, L.M., Hoppe, A.D., Christensen, K.A., and Swanson, J.A. (2006). Membrane perforations in-

- hibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. *Cellular Microbiology* 8, 781–792.
- Shedlock, D.J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science*. 2003 Apr 11;300(5617):337-9.
- Slifman, N.R., Gershon, S.K., Lee, J.-H., Edwards, E.T., and Braun, M.M. (2003). *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor γ -neutralizing agents. *Arthritis & Rheumatism* 48, 319–324.
- Sokke Umeshappa, C., Hebbandi Nanjundappa, R., Xie, Y., Freywald, A., Deng, Y., Ma, H., and Xiang, J. (2012). CD154 and IL-2 Signaling of CD4⁺ T Cells Play a Critical Role in Multiple Phases of CD8⁺ CTL Responses Following Adenovirus Vaccination. *PLoS ONE* 7, e47004–e47012.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol*. 2002 Feb;43(3):793-808.
- Soudais, C., Samassa, F., Sarkis, M., Le Bourhis, L., Bessoles, S., Blanot, D., Hervé, M., Schmidt, F., Mengin-Lecreulx, D., and Lantz, O. (2015). In Vitro and In Vivo Analysis of the Gram-Negative Bacteria-Derived Riboflavin Precursor Derivatives Activating Mouse MAIT Cells. *The Journal of Immunology* 194, 4641–4649.
- Sousa, C.R.E. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):476-83.
- Steele, S., Radlinski, L., Taft-Benz, S., Brunton, J. & Kawula, T. H. (2016). Trogocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Elife*. 2016 Jan 23;5. pii: e10625. doi: 10.7554/eLife.10625.
- Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Feb;11(1):38-45. doi: 10.1016/j.mib.2008.01.002.
- Steinman R. M., Lustig D. S., Cohn Z. A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med*. 1974 Jun 1;139(6):1431-45.

- Takeuchi, O., Akira, S., and Takeda, K. (1999). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol.* 2000 Jan;12(1):113-7.
- Tham, T.N., Gouin, E., Rubinstein, E., Boucheix, C., Cossart, P., and Pizarro-Cerda, J. (2009). Tetraspanin CD81 Is Required for *Listeria monocytogenes* Invasion. *Infection and Immunity* 78, 204–209.
- Thiemermann C., Szabó C., Mitchell J. A., Vane J. R. (1993). Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 1;90(1):267-71.
- Torraca, V., and Mostowy, S. (2016). Septins and Bacterial Infection. *Front Cell Dev Biol.* 2016 Nov 11;4:127.
- Treiner E., Duban L., Bahram S., Radosavljevic M., Wanner V., Tilloy F., Affaticati P., Gilfillan S., Lantz O.(2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature.* 2003 Mar 13;422(6928):164-9.
- Van Kaer L., Ashton-Rickardt P. G., Ploegh H. L., Tonegawa S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell.* 1992 Dec 24;71(7):1205-14.
- Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., Garcia, B., Ruiz de los Mozos, I., Solano, C., Toledo-Arana, A., Penades, J.R., and Lasa, I. (2009). Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Foreign-Body Infections. *Infection and Immunity* 77, 3978–3991.
- Wetzel S. A. and Parker D. C., (2006). MHC transfer from APC to T cells following antigen recognition. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(1):1-21.
- Whitmire J. K., Slifka M. K., Grewal I. S., Flavell R. A., Ahmed R. (1996). CD40 Ligand-Deficient Mice Generate a Normal Primary Cytotoxic T-Lymphocyte Response but a Defective Humoral Response to a Viral Infection. *J Virol.* 1996 Dec;70(12):8375-81.
- Wolchok J. D. and Chan T. A. (2014). Cancer: Antitumour immunity gets a boost. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):496-8. doi: 10.1038/515496a.
- Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernández, A., Almeida, C., Oliveira, V.G., Faro, J., and Graca, L. (2011). Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J. Immunol.* 187, 4553–

4560.

Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1016-22. doi: 10.1038/nm.2015.

Yiwen, Z., Shilin, G., Yigshi, C., Lishi, S., and Hui, Z. (2016). Efficient generation of antigen-specific CTLs by the BAFF-activated human B Lymphocytes as APCs: a novel approach for immunotherapy. *Oncotarget.* 2016 Nov 22;7(47):77732-77748. doi: 10.18632/oncotarget.12792.

Yokosuka, T., and Saito, T. (2009). The Immunological Synapse, TCR Microclusters, and T Cell Activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;340:81-107. doi: 10.1007/978-3-642-03858-7_5.

Zheng, Y., and Rudensky, A.Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol.* 2007 May;8(5):457-62.

Phillipe Pierre (2005). Dendritic cells, DRiPs, and DALIS in the control of antigen processing. *Immunol Rev.* 2005 Oct;207:184-90.

Anexos

Anexo 1: Pies de figuras vídeos

Vídeo 1. Polarización de las bacterias en una DC infectada de ratón hacia el contacto con un linfocito T CD4⁺ durante la sinapsis inmune. DC generadas *in vitro* a partir de los progenitores de médula ósea (ver sección Materiales y Métodos) fueron activados, decorados con pOVA-II e infectados con *Salmonella-GFP* en una MOI 10:1 (10 bacterias por cada DC). Tras 1 hora de infección se lavaron y pusieron en contacto con linfocitos T CD4⁺ purificados de ratones transgénicos OT-II en una proporción 2:1 (linfocito:DC). Los conjugados linfocito-DC se observaron mediante microscopía de fluorescencia en una atmósfera estable 37°C, 5% CO₂. Se tomaron imágenes de fluorescencia, para detectar las bacterias, y de contraste de fases para detectar las células) cada 5 segundos en un microscopio de campo ancho (DMI-RE2; Leica). En el vídeo se muestra la superposición de las imágenes (fluorescencia; GFP + contraste de fases) realizada con el software ImageJ. La barra de tamaño indica 10 µm. Los linfocitos (en este caso la célula pequeña) se marcaron con CellTrace violet para su identificación (no mostrado)

Vídeo 2. Captura de las bacterias por linfocitos humanos desde DC infectadas durante la sinapsis inmune. DC generadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica humana, fueron activados, decorados con SEE e infectados con *Salmonella-GFP* en una MOI 10:1. Tras 1 hora de infección se lavaron y pusieron en contacto con linfoblastos T, previamente expandidos en presencia de SEE. Se observaron mediante microscopía de fluorescencia en una atmósfera estable 37°C, 5% CO₂. Se tomaron imágenes de cada longitud de onda cada 3 segundos. En el vídeo se muestra la superposición de las imágenes (fluorescencia; GFP + contraste de fases) realizada con el software ImageJ. La barra de tamaño indica 10 µm. Los linfocitos se marcaron con CellTrace violet para su identificación (Fig 4.3.A)

Vídeo 3. Captura de las bacterias por linfocitos de ratón desde DC infectadas durante la sinapsis inmune. DC generadas *in vitro* a partir de los progenitores de médula ósea fueron activados, decorados con pOVA-II e infectados con *Listeria-GFP* en una MOI 10:1 (bacterias por DC). Tras 1 hora de infección se lavaron y pusieron en contacto con linfocitos T CD4⁺ purificados de ratones transgénicos OT-II. Los

conjugados linfocito-DC se observaron mediante microscopía de fluorescencia en una atmósfera estable 37°C, 5% CO₂. Se tomaron imágenes de fluorescencia, para detectar las bacterias, y de contraste de fases para detectar las células) cada 2 segundos en un microscopio de campo ancho (DMIRE2; Leica). En el vídeo se muestra la superposición de las imágenes (fluorescencia; GFP + contraste de fases) realizada con el software ImageJ. La barra de tamaño indica 10 µm. Los linfocitos (en este caso la célula pequeña) se marcaron con CellTrace violet para su identificación (no mostrado)

Vídeo 4 y 5. Polarización de bacterias hacia la IS observada por crío-tomografía de rayos X suaves. El vídeo 4 se corresponde con las figuras 4.3.G-H, se observa una *Salmonella-GFP* en el proceso de paso desde la DC al linfocito T CD4⁺ de ratón durante la formación de la IS. En la primera parte del vídeo se muestran las imágenes sin segmentar, luego se muestran las imágenes procesadas; el linfocito T CD4⁺ en cian, las bacterias en rojo, la DC en gris, el núcleo del linfocito en azul oscuro. El video 5 se realizó mediante el mismo procesamiento y muestra, en este caso las bacterias aparecen encapsuladas o envueltas en membrana, algo que ya habíamos visto en la microscopía confocal, y en aproximación al contacto con el linfocito.

Vídeo 6. Linfocitos T CD4⁺tf establecen IS con linfocitos T CD8⁺ vírgenes. Reconstrucción 3D a partir de imágenes de microscopía confocal de una IS formada por un linfocito T CD4⁺tf *Listeria-OVA* (no marcado) como célula presentadora y un linfocito T CD8⁺ OT-I virgen (CD25⁻) (gris) la actina se muestra en cian. Se aprecia claramente el anillo de actina típico del pSMAC, indicador de la formación de una IS funcional.

Anexo 2: Publicaciones

Aranzazu Cruz-Adalia, Guillermo Ramírez-Santiago, Mónica Torres-Torresano, Raquel Garcia-Ferreras, Esteban Veiga Chacón. T Cells Capture Bacteria by Transinfection from Dendritic Cells. JoVE 2016

Ramírez-Santiago G, Robles-Valero J, Morlino G, Cruz-Adalia A, Pérez-Martínez M, Zaldivar A, Torres-Torresano M, Chichón FJ, Sorrentino A, Pereiro E, Carrascosa JL, Megías D, Sorzano CO, Sánchez-Madrid F, Veiga E. Clathrin regulates lymphocyte migration by driving actin accumulation at the cellular leading edge. Journal of European Immunology 2016.

Aranzazu Cruz-Adalia, Guillermo Ramirez-Santiago, Carmen Calabia-Linares, Monica Torres-Torresano, Lidia Feo, Marta Galan-Diez, Elena Fernandez-Ruiz, Gloria Martinez del Hoyo, Francisco Sanchez-Madrid, Esteban Veiga. Bacterial transfer to T lymphocytes through the Immunological Synapse. Cell Host and Microbe 2014.

Patente : Linfocitos transinfectados para terapia anti-tumoral. Authors: Esteban Veiga Chacón; Aranzazu Cruz Adalia; Guillermo Ramirez Santiago; Balbino Alarcon Sanchez; Francisco Sanchez Madrid. Entidad titular de derechos: CSIC/UAM. Nº de solicitud: P201531177. Country: España. Registration date: 07/08/2015.

T Cells Kill Bacteria Captured by Transinfection from Dendritic Cells and Confer Protection in Mice

Aránzazu Cruz-Adalia,^{1,2} Guillermo Ramirez-Santiago,^{1,2} Carmen Calabia-Linares,² Mónica Torres-Torresano,^{1,2} Lidia Feo,² Marta Galán-Díez,^{3,4} Elena Fernández-Ruiz,³ Eva Pereiro,⁵ Peter Guttman,⁶ Michele Chiappi,⁷ Gerd Schneider,⁶ José López Carrascosa,^{7,8} Francisco Javier Chichón,⁷ Gloria Martínez del Hoyo,⁹ Francisco Sánchez-Madrid,³ and Esteban Veiga^{1,2,*}

¹Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Department of Molecular and Cellular Biology, Darwin, 3, 28049 Madrid, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital de Santa Cristina, 28009 Madrid, Spain

³Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital de la Princesa, 28006 Madrid, Spain

⁴Microbiology and Immunology Department, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA

⁵ALBA Synchrotron Light Source, MISTRAL Beamline–Experiments Division, Cerdanyola del Vallès, 08290 Barcelona, Spain

⁶Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH, Institute Soft Matters and Functional Materials, Electron Storage Ring BESSY II, Albert-Einstein-Strasse 15, 12489 Berlin, Germany

⁷Department Macromolecular, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin, 3, 28049 Madrid, Spain

⁸Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA Nanociencia), 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

⁹Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Spain

*Correspondence: veiga@cnb.csic.es

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.006>

SUMMARY

Dendritic cells (DCs) phagocytose, process, and present bacterial antigens to T lymphocytes to trigger adaptive immunity. In vivo, bacteria can also be found inside T lymphocytes. However, T cells are refractory to direct bacterial infection, leaving the mechanisms by which bacteria invade T cells unclear. We show that T cells take up bacteria from infected DCs by the process of transinfection, which requires direct contact between the two cells and is enhanced by antigen recognition. Prior to transfer, bacteria localize to the immunological synapse, an intimate DC/T cell contact structure that activates T cells. Strikingly, T cells efficiently eliminate the transinfecting bacteria within the first hours after infection. Transinfected T cells produced high levels of proinflammatory cytokines and were able to protect mice from bacterial challenge following adoptive transfer. Thus, T lymphocytes can capture and kill bacteria in a manner reminiscent of innate immunity.

INTRODUCTION

During infections, APCs, e.g., DCs, phagocytose and process bacteria, migrate to the lymph nodes, and present bacterial antigens to naive T cells (Kaufmann and Schaible, 2005; Steinman, 1991; Waite et al., 2011). Bacterial destruction by APCs is not always complete (Cossart and Sansonetti, 2004), and it has been shown that infected DCs containing live bacteria move from infected tissues to the lymph nodes, where they are able to contact with T cells (Waite et al., 2011). Antigen presentation occurs through the formation of the immunological synapse (IS), an organized functional structure formed by the

intimate contact between T cell and antigen-loaded APC (Dustin, 2008; Saito and Batista, 2010). IS formation is the main mechanism of T cell activation, is crucial for the adaptive immune response (Cemerski and Shaw, 2006; Saito and Batista, 2010), and drives major morphological changes in the T cell, including massive actin rearrangements at the cell-to-cell contact zone (Calabia-Linares et al., 2011). Moreover, the intimate contacts of APC and T cells during IS serve as platforms for exchange membranes, exosomes, and genetic material (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012). In addition, the IS can be hijacked by some viruses (i.e., HIV). CD4⁺ T cells are the main target of HIV, and it has been shown that HIV efficiently transinfects T cells from infected DCs (Geijtenbeek et al., 2000). The exact route of viral transinfection is not clear, and several mechanisms, including hijacking the exosome delivery pathway, have been proposed (Izquierdo-Useros et al., 2010). In this view, DCs capture HIV in the peripheral tissues and then migrate to the lymph nodes, where HIV-1 transfers toward CD4⁺ T cells and start the spread of infection (Geijtenbeek et al., 2000; Izquierdo-Useros et al., 2010). Some pathogenic bacteria (i.e., *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri*) are also able to invade T cells in vivo (McElroy et al., 2009; Salgado-Pabón et al., 2013), and modify the behavior of the infected T cells (Salgado-Pabón et al., 2013). However, since primary T cells are poorly infected in vitro (see the Results), the route followed by pathogenic bacteria to infect T cells remained unknown. Bacterial interactions with T cells have been poorly studied, since the accepted dogma is that T cells, which drive the adaptive immunity, exert their role resolving infections in *trans*, by secreting cytokines after being specifically stimulated with the proper antigens recognized by their TCRs (Müller et al., 2012; Oykhman and Mody, 2010). Using primary cells from mice and human origin (in order to avoid cell line-derived artifacts, we decided to work with primary cells), we show unexpected roles for T cells that expand the commonly accepted functions of lymphocytes; T cells are able to take up bacteria from infected DCs

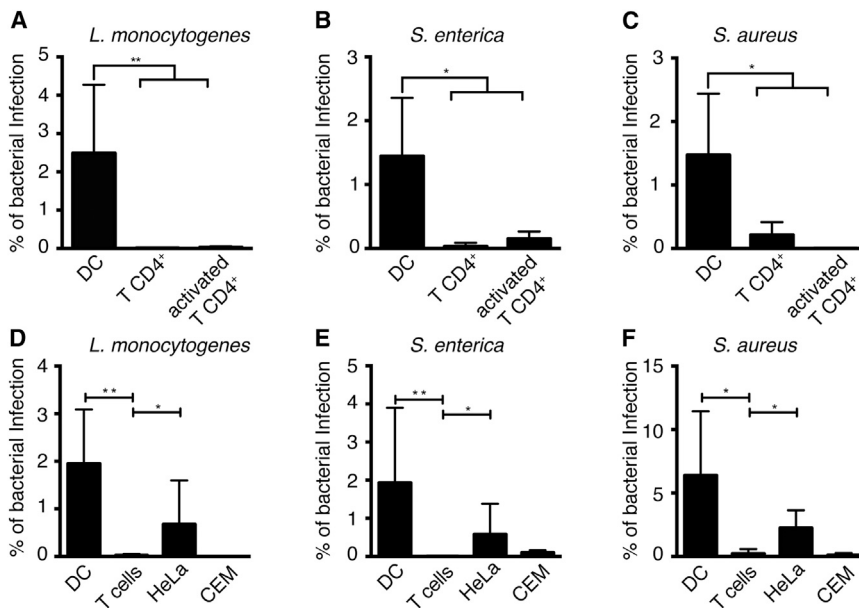


Figure 1. T Cells Are Refractory to Direct Bacterial Infection

Gentamicin survival assays showing the rate of bacterial infection of the indicated cells from mouse (A–C) and human (D–F) origin. When indicated, lymph node cells were incubated with OVAp, and after 24 hr activated CD4⁺ T cells were isolated. The column bars represent the mean of at least three independent experiments. Error bars indicate the SD. Significant differences are represented by asterisk.

(bacterial transinfection) and then efficiently kill them, similarly to cells of the innate immune system. Transinfected T cells secrete larger amounts of proinflammatory cytokines (IL-6, interferon- γ and, TNF- α) that have been known from long to play an important role in bacterial elimination in vivo (Nakane et al., 1992) than noninfected T cells, and block bacterial infection in vivo.

RESULTS

Primary T Cells Are Refractory to Direct Bacterial Infection

Three different bacteria species (*Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*) were used to infect naive or antigen-activated CD4⁺ T cells isolated from mice lymph nodes. All three bacteria infected CD4⁺ T cells very poorly compared to LPS-activated, mature, bone marrow-derived DCs (Figures 1A–1C). Similar results (poor bacterial infections) were observed using human primary T lymphoblasts compared to monocyte-derived DCs or HeLa cells, used as positive controls (Figures 1D–1F). These data reveal that primary T cells are refractory to direct bacterial infection. These data, together with the fact that bacteria can be found inside T cells in vivo, prompted us to hypothesize that bacteria could transinfect T cells from infected APCs during antigen presentation.

Bacteria Infecting DCs Localized at the IS Shortly after T Cell Contact

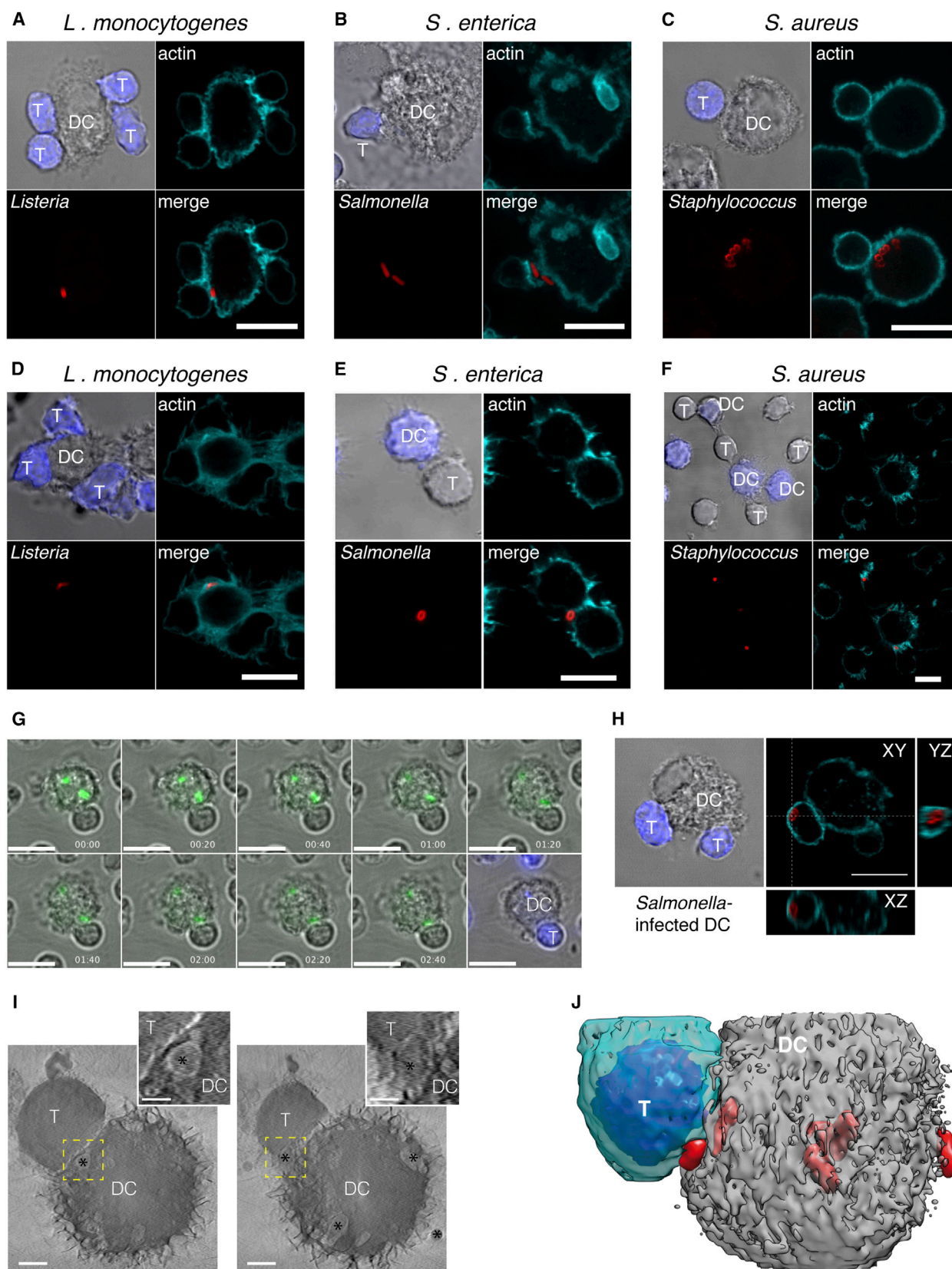
We imaged the subcellular localization of bacteria during the formation of the IS between infected DCs contacting noninfected T cells (Figure 2). Mouse bone marrow-derived dendritic cells (mDCs) loaded with OVA peptide (OVAp) were infected with *L. monocytogenes*, *S. enterica*, or *S. aureus* and coincubated with CD4⁺ T cells from transgenic OTII mice, which bear a TCR specific for OVAp (Barnden et al., 1998). Bacteria polarized toward the DC-T cell contact area during IS formation (Figures

2A–2C). Similar observations were made using infected human monocyte-derived DCs (hDCs) loaded with superantigen E (SEE) and human T lymphoblasts recognizing SEE (TCR bearing V β 8⁺ chains [Niedergang et al., 1998]) (Figures 2D–2F). The formation of active IS was confirmed by the polarization of the microtubules organizing center (MTOC) and CD3 (see Figure S1 available online).

Note that protein accumulation in the IS in primary cells is less evident than using cell lines (Reichardt et al., 2010). Polarization of bacteria during IS formation was confirmed by live cell imaging (Figures 2G and S2A; Movie S1 and Movie S2). Moreover, bacteria were able to transinfect T cells from contacting infected DCs (Figures 2H and S2B–S2G; Movie S3, Movie S4, Movie S5, and Movie S6). Bacterial localization in the IS was further confirmed by high-resolution cryo-Soft X-ray tomography (cryo-SXT) (Figures 2I and 2J; Movie S7). This unconventional technology allows the imaging of whole cells maintained frozen in their native state avoiding the artifacts of fixation and sectioning, and without the use of any contrasting agent (Schneider et al., 2010).

T Cells Take Up Bacteria by Transinfection from DCs

The process of bacterial transinfection from infected DCs toward contacting T cells was quantified by T cells' reisolation after conjugate formation, followed by classical gentamicin survival assays (Pizarro-Cerda and Cossart, 2010; Vaudaux and Waldvogel, 1979). This sensitive method allowed us to analyze a large number of conjugates. The requirement of cell-to-cell contact was tested by using polycarbonate filter-containing chambers impeding cellular contact between infected DCs and T cells and the role of antigen presentation by loading DCs with OVAp or SEE for mouse or human cells, respectively (Figure S3A). Regarding the mouse-cell model, the maximal bacterial uptake by CD4⁺ T cells occurs when cell-to-cell contact is allowed and infected DCs presented OVAp (Figures 3A–3C), which is consistent with IS-mediated bacterial transinfection and was similar for the three bacteria tested. When cell-to-cell contacts were impeded, the infection was very low and similar to direct incubation of the bacteria with the CD4⁺ T cells (negative control). Only experiments with purity >97% of the reisolated T cells were taken into account (Figure 3D), and the colony-forming units (CFUs) from the contaminants were subtracted. The relevance of antigen presentation during transinfection



(legend on next page)

was additionally confirmed by flow cytometry. After conjugate formation, intracellular bacteria in CD4⁺ T cells were detected by differential immunolabeling (Figure S3B). The maximal bacterial uptake by CD4⁺ T cells occurred when DCs presented OVAp (Figure 3E). To further confirm this, infected DCs were allowed to form conjugates simultaneously with both CD4⁺ T cells isolated from wild-type mice (with no specificity for OVAp) and OT-II mice (OVAp specific). Infection was reduced in T cells isolated from wild-type mice (Figure 3F), demonstrating that antigen specificity enhanced bacterial transfer. Note that bacterial association with DCs was unaffected by the presence of antigen (Figure S4A), and preactivation of T cells has no effect in bacterial transinfection (Figure S4B). Moreover, the presence of anti-LFA-1, previously described to block partially cell-cell conjugate and IS formation (Sanchez-Madrid et al., 1983), reduced bacterial spreading (Figure 3G). Transinfection of nonpathogenic *Escherichia coli* (DH5 α) was similar to that observed with pathogen species (Figure S4C); thus, virulence factors do not seem to be strictly necessary for this process.

In order to test whether bacterial transinfection also occurs in CD8⁺ T cells, we used CD8⁺ T cells isolated from OT-I transgenic mice, which produce MHC class I-restricted, specific for the ovalbumin peptide (257–264) (Hogquist et al., 1994). As observed in CD4⁺ T cells, transinfection requires cell-to-cell contact and was maximal in the presence of antigen (Figure 3H).

Similar results were observed in the human-model using SEE as antigen (Figures 4A–4C); maximal bacterial transfer (for all bacteria tested) was observed when cell-to-cell contact was allowed and in the presence of antigen. T cell infection rates were higher in the human-cell model, probably as a consequence of strong T cell activation produced by superantigens (Niedergang et al., 1998). Figure 4D shows the purity of the reisolated T cells from a representative experiment; note that only experiments with purity >97% were taken into account, and the CFUs from the contaminants were subtracted. The relevance of antigen presentation was confirmed by flow cytometry experiments (Figure 4E). Moreover, bacterial transinfection of T cells was also reduced by anti-human LFA-1 antibody (Campanero et al., 1993) (Figure 4F). To further confirm that antigen-dependent contact is necessary for bacterial transinfection to occur, and that transinfection is not only due to sustained cell-to-cell contact, we forced infected DC to contact T cells using an aggregation-inducer anti-CD43 antibody (Serrador et al., 1998). However, engagement of CD43, that induced massive cellular aggregates (data not shown), did not increase the number of transinfected bacteria in T cells (Figure S4D). A nonpathogenic

mutant strain of *S. aureus* lacking the sortase gene (Δ srt) (Vergara-Irigaray et al., 2009) was also efficiently transferred to human T cells when IS formation was allowed (Figure S4E), demonstrating again that virulence factors do not seem to be strictly necessary for bacterial transfer from DCs to T cells. Additionally, we showed that this process was specific for bacteria and not for any phagocytosed particle by incubating DC with fluorescent polystyrene beads. T cells were unable to take up beads from DCs (Figure 5A), despite the fact that more DCs appeared associated with beads than with bacteria (Figure S4F) and that T cells were able to capture beads directly from the medium (Figure 5A). In addition, DCs were incubated with beads, or with beads and *L. monocytogenes* at the same time (with no differences in beads uptake by DC; data not shown). The presence of bacteria did not increase the capture of beads by T cells (Figure 5B). All these data show that during IS formation T cells are able to specifically take up bacteria from DCs.

Bacterial Transinfection Requires Active T Cell Cytoskeleton

The IS formation triggers dramatic changes in the cytoskeleton of T cells (Calabia-Linares et al., 2011; Gomez et al., 2005). Interestingly, T cells actively extend pseudopodia toward the infected DCs (Movie S2, Movie S3, Movie S4, and Movie S5), in agreement with recent observations (Ueda et al., 2011). To study whether the T cell cytoskeleton participates in bacterial uptake through the IS, we incubated T cells with either cytochalasin D or colchicine to disrupt the actin filaments or the microtubules, respectively. Either drug inhibited T cell bacterial uptake from infected DCs in the human and murine models (Figures 5C, 5D, and S5), indicating that T cell cytoskeleton plays a major role in this process.

T Cells Uptake Both Intracellular and Surface-Exposed Bacteria from Infected DCs

To determine whether T cells capture bacteria from the inside or associated to the surface of the DCs, we used gentamicin to kill extracellular bacteria. In the presence of gentamicin (condition 1), only intracellular translocation of bacteria was allowed. When gentamicin was washed out before conjugation with T cells, DCs intracellular bacteria were able to translocate to T cells either directly from inside of DCs to the interior of T cells or through an extracellular step before entering T cells (condition 2). In the absence of gentamicin (condition 3), both extracellular and intracellular, bacterial transfers were allowed (Figure S6A). Maximum uptake of *L. monocytogenes* by T cells was observed in condition 3 (2-fold compared to

Figure 2. Bacteria Localize at the IS Shortly after Conjugate Formation

(A–F) confocal images of antigen-loaded DCs infected with the indicated bacteria (red) coincubated during 30 min with noninfected primary T cells. Actin is shown in cyan. (A–C) mDCs (not stained) and mouse CD4⁺ T cells (blue) are shown. Human T lymphoblasts are shown in blue (D) or nonstained (E and F). hDCs are shown in blue (E and F) or not stained (D).

(G) Live-cell time series showing the contact between *S. enterica*-GFP-infected mDC and T cell from Movie S1.

(H) Orthogonal view of sample as in (B), with *S. enterica* inside transinfected T cell. Bars represent 10 μ m in (A–H).

(I) Virtual slices of a cryo soft X-ray tomogram acquired at BESSY-II from a T cell (T) interacting with an *S. enterica*-infected DC. The asterisks mark the position of *Salmonella*. The indicated bacteria are inside DC close to the IS (left) and outside DC and being engulfed by the T cell (right). Inset shows a detailed position of bacteria. Scale bars represent 2 micron and 1 micron in the insets.

(J) Volumetric representation of the cryo soft X-ray tomogram shown in (I). Bacteria are represented in red, T cell in cyan, and DC in gray. The nucleus of the T cell is shown in blue.

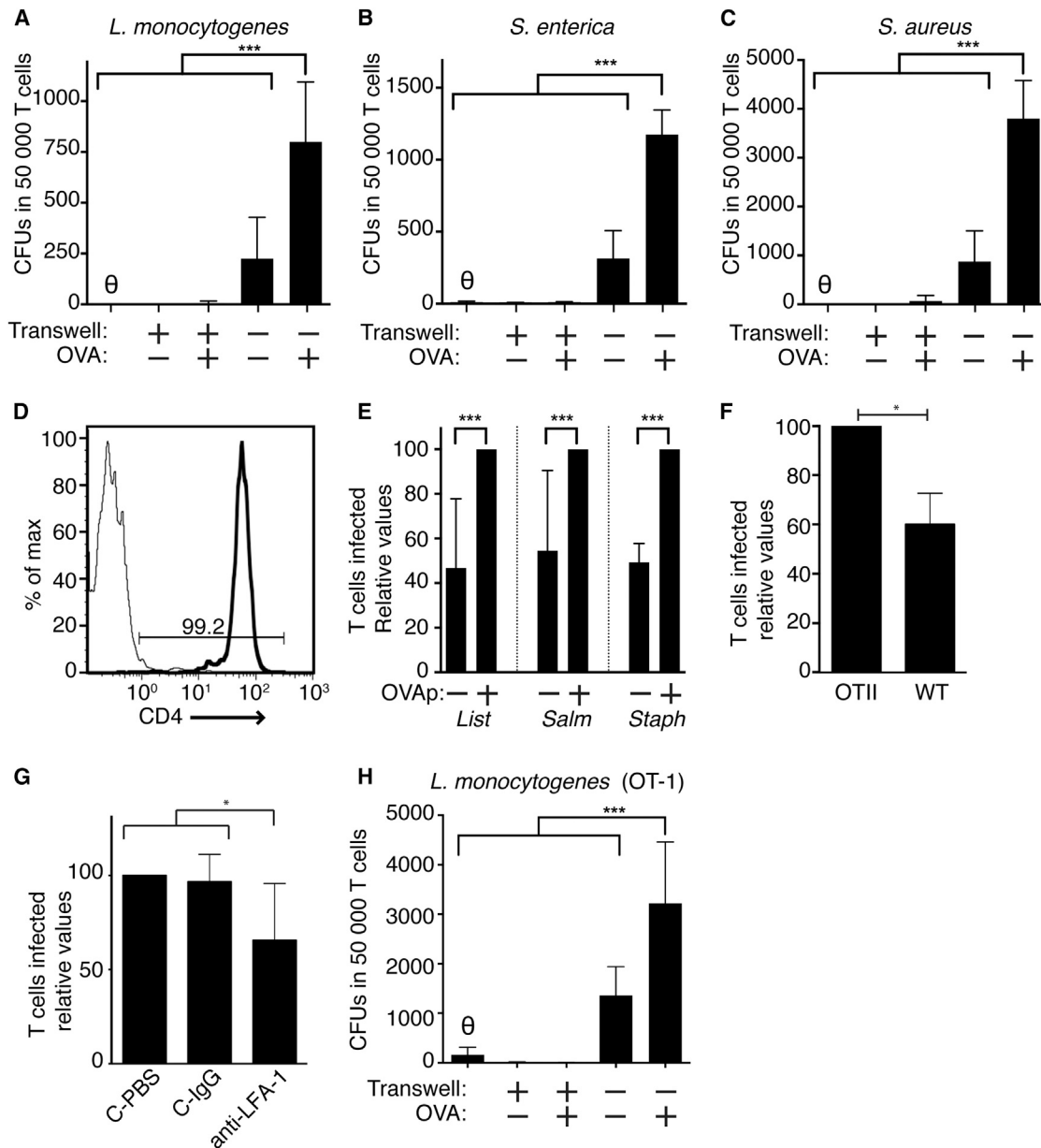


Figure 3. Bacterial Transinfection Is Enhanced by Antigen Presentation

(A–C) mDC were loaded (or not) with OVAp (OVA) and infected with the indicated bacteria, followed by coincubation with CD4⁺ T cells in conditions that allow DC–T cell interactions for 30 min, or in the presence of a polycarbonate barrier (transwell) impeding such interactions. After conjugate formation, CD4⁺ T cells were reisolated, and classical gentamicin survival assays were performed. Shown are the CFUs corresponding to 50,000 CD4⁺ T cells. θ indicates direct infection of bacteria in T cells.

(D) Representative experiment of flow cytometry showing the purity of reisolated T cells before performing gentamicin survival assay. Thick line shows the percentage of CD4⁺ cells, and thin line shows the antibody negative control.

(E) The rate of CD4⁺ T cells harboring intracellular bacteria (CD11c⁺, CMAC⁺, extracellular bacteria⁺, total bacteria⁺) was determined by flow cytometry.

(F) OVAp-loaded, *Salmonella*-infected DCs were coincubated with a mix (ratio 1:1) of CD4⁺ T cells from OT-II and WT mice (stained differentially with CMAC). CD4⁺ T cell populations were differentiated by flow cytometry. Infection of OT-II T cells was taken as 100%.

(G) *S. enterica*-infected and OVAp-loaded mDCs were treated with anti-LFA-1 antibody (M17/4), control isotype IgG, or just PBS before coincubation with T cells. T cell infection rate in nontreated samples was taken as 100%.

(H) Similarly to (A)–(C) but using CD8⁺ T cells isolated from OT-I mice and conjugated with mDCs loaded with its specific OVA peptide.

Column bars represent the mean of at least three independent experiments. Error bars indicate the SD. Significant differences are represented by asterisk.

condition 2). In condition 1, T cells acquired approximately 50% of bacteria they took up in condition 2 (Figure 5E). These data show that T cells captured both extracellular and intracellular

L. monocytogenes from DCs, and that intracellular bacteria were able to undergo an extracellular step before entering T cells.

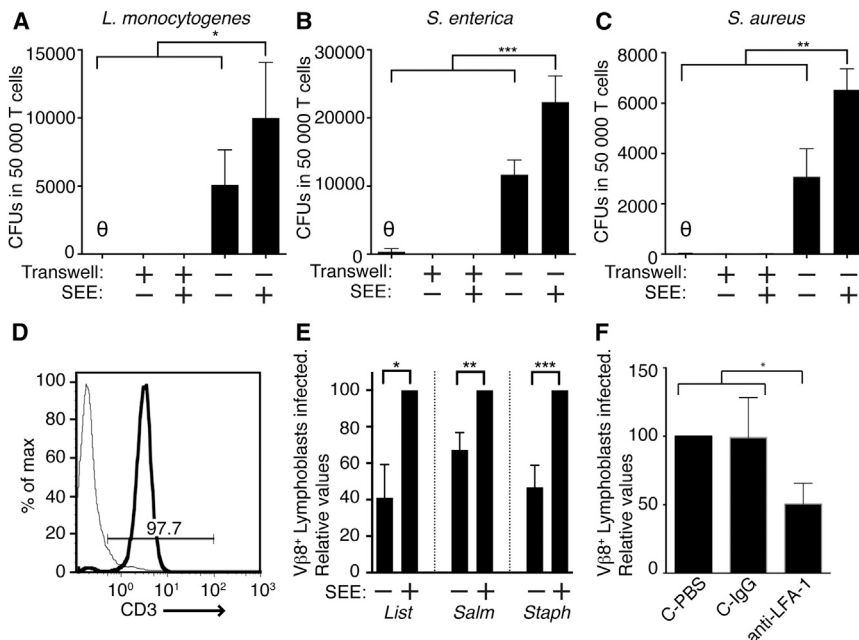


Figure 4. Bacterial Transinfection in Human Cells Model

(A–C) hDC were loaded (or not) with SEE and infected with the indicated bacteria followed by coincubation with Vβ8⁺-enriched T lymphoblasts in conditions that allow DC–T cell interactions, or in the presence of a polycarbonate barrier (transwell) impeding such interactions. After conjugate formation, T cells were reisolated, and classical gentamicin survival assays were performed. Shown are the CFUs corresponding to 50,000 T cells. θ indicates direct infection of bacteria in T cells.

(D) Representative experiment of flow cytometry showing the purity of reisolated T cells before performing gentamicin survival assay. Thick line shows the percentage of CD3⁺ cells; thin line shows the antibody negative control.

(E) The rate Vβ8⁺ T lymphoblasts harboring intracellular bacteria (DC–SIGN⁺, Vβ8⁺, extracellular bacteria⁺, total bacteria⁺) was determined by flow cytometry.

(F) SEE-loaded, *Salmonella*-infected hDCs were incubated with anti LFA-1 antibody (Lia3.2), control isotype IgG, or just PBS before coincubation with T lymphoblasts. The rate of T lymphoblasts infected in nontreated samples was taken as 100%.

Column bars represent the mean of at least three independent experiments. Error bars indicate the SD. Significant differences are represented by asterisk.

T Cells Eliminate Uptaken Bacteria

L. monocytogenes-OVA (expressing the OVA protein in the bacterial surface) transinfected OT-II T cells ex vivo (Figure S6B). In order to test whether bacteria could transinfect T cells in vivo, OT-II mice were injected intravenously with *L. monocytogenes* and *L. monocytogenes*-OVA, and 24 hr after infection CD4⁺ T cells were harvested from the spleen and the presence of bacterial CFUs was assessed by standard gentamicin survival assay. *L. monocytogenes*-OVA transinfected CD4⁺ T cells more efficiently than *L. monocytogenes* nonexpressing OVAp (Figure 6A) (note that no differences in bacterial infection were found between *L. monocytogenes*-OVA and WT *L. monocytogenes* when WT C57BL/6 mice were infected; data not shown). Surprisingly, the amount of recovered bacteria was extremely low compared to what was observed ex vivo. This striking result prompted us to assess the fate of bacteria inside T cells. To address this, OVAp-loaded mDCs were infected with either *L. monocytogenes* or *S. enterica* and conjugated with CD4⁺ T cells from OTII mice. After conjugate formation, T cells were reisolated and CFUs were analyzed by gentamicin survival assays at different times. Unexpectedly, T cells rapidly killed the internalized bacteria (Figure 6B). Within the first hours after conjugate formation, more than 95% of the internalized *L. monocytogenes* and 90% of *S. enterica* were killed. As control for bacterial fitness, we measured CFUs after direct infection of HeLa cells (Figure 6C). No apparent damage of T cells was appreciated during the time course of the experiment. Similar results were observed in the human model: after bacteria transinfection, human T cells rapidly killed intracellular bacteria. Within the first hours after conjugate formation, more than 95% of the internalized *L. monocytogenes* were killed (Figure 6D).

In order to determine the cellular mechanisms involved in bacterial destruction, T cells were treated with different inhibitors before conjugate formation. As shown (Figure 6E), Pepstatin A, an inhibitor of aspartyl proteases and NH₄Cl which inhibits phagosome-lysosome fusion, partially inhibited intracellular bacterial degradation, suggesting that lysosome degradation plays an important role in intracellular bacterial clearance in T cells. On the contrary, MnTBAP and NAC inhibiting production of oxygen reactive species, 1400W, a potent and selective inhibitor of iNOS and L-NAME, an arginine analog inhibiting NO production, did not impede bacterial degradation inside T cells.

These results clearly show a role for CD4⁺ T lymphocytes during bacterial infections being able to internalize and clear the bacteria in a lysosome-dependent way.

Role of Transinfection in Bacterial Clearance

To further test the physiological relevance of this phenomenon, we analyzed first the cytokines secreted by CD4⁺ T cells from OT-II mice transinfected with *L. monocytogenes*. In order to optimize the number of T cells transinfected, we allowed conjugate formation for 24 hr. T cells were reisolated and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, and then the production of cytokines was quantified by cytometric bead array (CBA; Figure 7A). Transinfected CD4⁺ T cells secrete higher amounts of IL-6, interferon-γ, and TNF-α (typical proinflammatory cytokines) than noninfected CD4⁺ T cells.

To assess whether transinfection, and therefore bacteria killing and inflammatory cytokine secretion by CD4⁺ T cells, plays a role in bacterial clearance during in vivo infections, we performed adoptive transfer experiments. CD4⁺ T cells from OT-II (responding to OVA) or WT mice (not responding to OVA)

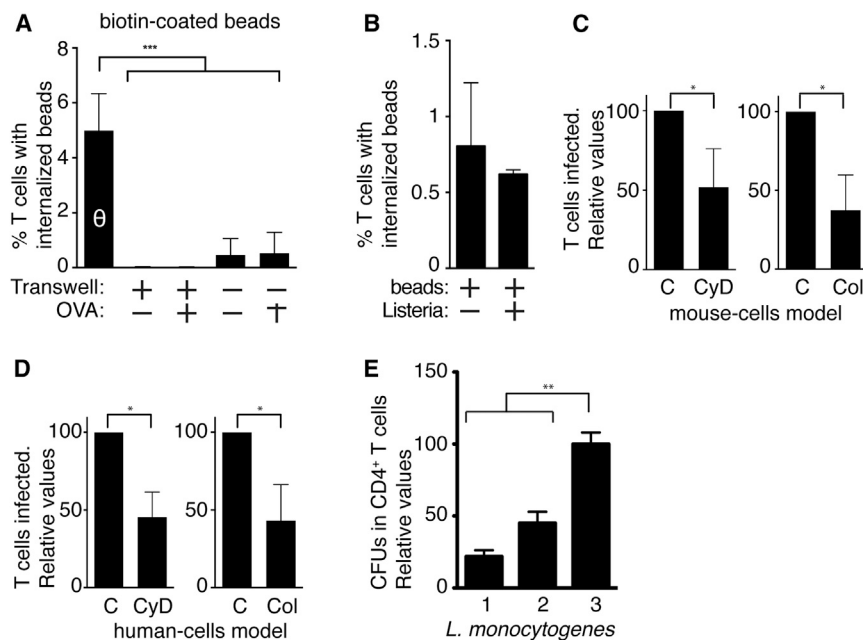


Figure 5. Transinfection Requires Active Cytoskeleton of T Cells

(A) mDCs were loaded (or not) with OVAp and fluorescent, biotin-coated microspheres. Then mDCs were coincubated with CMAC-stained CD4⁺ T cells in conditions that allow DC-T cell interactions, or in the presence of a polycarbonate barrier (transwell). CD4⁺ T cells harboring intracellular beads (CD11c⁻, CMAC⁺, extracellular beads⁻, total beads⁺) were detected by flow cytometry. θ indicates direct addition of beads to T cells.

(B) OVAp-loaded DC cells were incubated with fluorescent, biotin-coated microspheres together (or not) with *L. monocytogenes*. After 1 hr incubation with CD4⁺ T, the internalization of microspheres by T cells was analyzed by flow cytometry.

(C and D) (C) Mouse T cells or human V β 8⁺-enriched T lymphoblasts (D) were treated with cytochalasin D (CyD) or colchicine (Col), 30 min before coincubation with *S. enterica*-infected and antigen-loaded DCs. Infection observed (by flow cytometry) in controls was taken as 100%.

(E) *Listeria*-infected and OVAp-loaded mDCs were coincubated with CD4⁺ T cells from OTII mice. In condition 1, gentamicin was added before and

maintained during conjugate formation. In condition 2, gentamicin was removed before coincubation. In condition 3, no gentamicin was added. After coincubation, CD4⁺ T cells were reisolated, and gentamicin survival assay was performed. After normalization, CFUs observed in condition 3 were taken as 100. Column bars represent the mean of at least three independent experiments. Error bars indicate the SD. Significant differences are represented by asterisk.

were transferred into WT mice and tested for bacterial load in spleen and liver after bacterial (*Listeria*-OVA) challenge. In the first set of experiments, bacterial load was tested 24 hr after challenge. Here, we included one additional condition, OT-II CD4⁺ T cells transinfected with bacteria before being transferred into WT mice, to assure a large number of transinfected T cells. As shown (Figures 7B and 7C), transfer of both infected and noninfected OT-II T CD4⁺ cells protects slightly from bacteria, in both spleen and liver. Transfer of WT CD4⁺ T cells also protects from bacteria, but in a lesser extent than infected OT-II CD4⁺ T cells. The protection of OT-II CD4⁺ T cells was more evident at 48 hr after bacterial challenge (Figures 7D and 7E). In this case we assume that OT-II CD4⁺ cells were able to capture and destroy a large number of bacteria, and therefore we transferred only noninfected CD4⁺ T cells. We recovered ten times less bacteria from mice transferred with OT-II CD4⁺ cells than from mice treated with PBS or transferred with WT T cells.

DISCUSSION

Our data show that T cells are able to trap (from infected DC) and clear bacteria, behavior thought to be exclusive for cells of the innate immunity. We have found that T cells capture bacteria by transinfection from previously infected DCs during the course of antigen presentation, this pathway being much more efficient than direct bacterial infection on T cells. This applies also to nonpathogenic strains, indicating that virulence factors are not necessary and that T cells actively guide this pathway. This is further supported by the fact that T cell cytoskeleton is necessary for bacterial uptake. Some viruses, such as HIV, use a similar transinfection pathway, from infected DC toward T cell (Izquierdo-Useros et al., 2010); it therefore appears that the IS

is a major platform to T cell infection. Our data show that T cells specifically take up bacteria, but not any particle present in DCs (i.e., latex beads). It seems that T cells recognize bacterial components when bacteria are associated to DCs, as shown by the fact that T cells did not take up beads even in the presence of bacteria. The possible role of T cells PRRs (pattern recognition receptors) in transinfection and further cytokine secretion remains to be elucidated.

Unexpectedly, T cells kill intracellular bacteria (similarly to professional phagocytes) and did it more efficiently than DCs (Figure S6C). This striking result shows that cells of the adaptive immunity can support functions similar to those of the innate immunity. Moreover, transinfected CD4⁺ T cells secrete more inflammatory cytokines than noninfected (but activated) ones. These roles of CD4⁺ T cells in bacterial uptake and killing, together with proinflammatory cytokine secretion and therefore recruitment and activation of cells of the innate immune system, result in potent weapons in the antibacterial fight, confirmed by in vivo experiments. *Listeria* infection in the spleen normally would develop toward chronic infection unless adaptive T cell response takes place. Adaptive T cell response is usually observed later (more than 3 days after challenge) (Bregenholt et al., 2001; Waite et al., 2011); therefore the rapid antibacterial activity we observed indicates that bacterial transinfection may play an important role in this rapid T cell-driven antibacterial clearance. Our data are in accordance with previous observations, showing that proinflammatory cytokine response is important in *Listeria* elimination (Dai et al., 1997; Ehlers et al., 1992; Nakane et al., 1992).

In the present manuscript, we focused on the role of CD4⁺ T cells during bacterial transinfection; however, the DC could also play a pivotal role. The DC-T cell interaction is absolutely

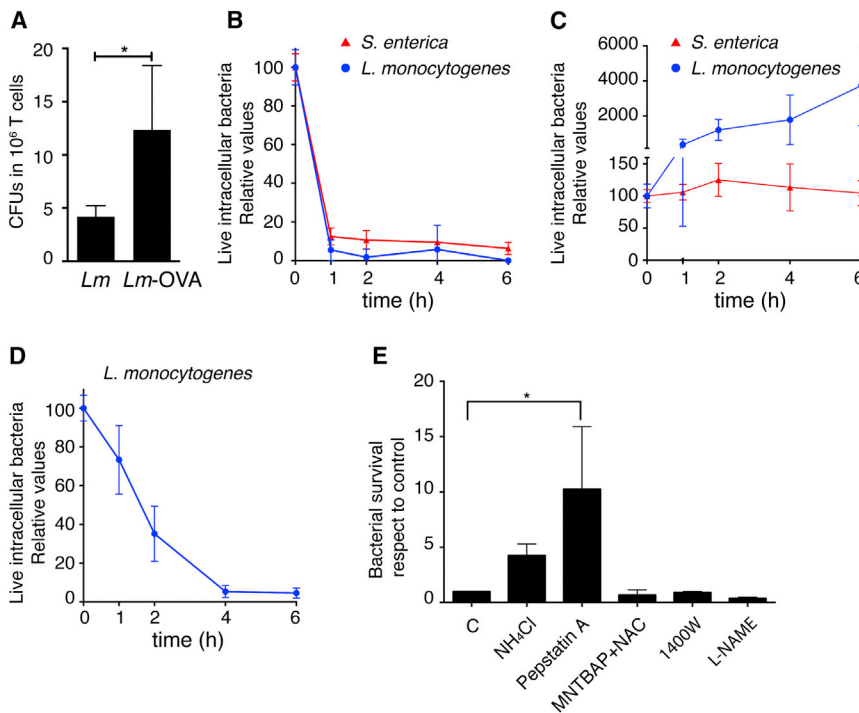


Figure 6. T CD4⁺ Cells Efficiently Kill Transinfected Bacteria

(A) OTII mice were injected with *L. monocytogenes* WT (*Lm*) or *L. monocytogenes*-OVA (*Lm*-OVA). Twenty-four hours after bacterial challenge, CD4⁺ T cells were isolated from spleen, and intracellular live bacteria (CFUs) were detected by gentamicin survival assays.

(B and C) (B) Bacteria-infected and OVAp-loaded mDCs were coincubated with CD4⁺ T cells from OTII mice. After conjugate formation, CD4⁺ T cells were reisolated, and intracellular bacteria were detected by gentamicin survival assays at different times. Data were normalized with respect to that observed in time 0. As control of the bacterial fitness, in parallel, HeLa cells were directly infected (C).

(D) *L. monocytogenes* survival inside human T lymphoblasts. Experiments were performed as in (B), but using human T lymphoblasts and infected SEE-loaded hDCs.

(E) Mouse CD4⁺ T cells were treated with the indicated inhibitors, before coincubation with *L. monocytogenes*-infected and antigen-loaded DCs.

After conjugate formation, CD4⁺ T cells were reisolated and maintained in medium containing the inhibitors. Bacterial survival was tested by gentamicin survival assays, and survival rate was obtained comparing the CFUs counted at time 0

(bacterial entry) with CFUs counted in samples tested 2 hr after conjugate formation. Survival rate of control cells was arbitrarily considered as 1. Column bars represent the mean of at least three independent experiments. Error bars indicate the SD. Significant differences are represented by asterisk.

necessary for transinfection to occur, and antigen presentation greatly increases the number of bacteria inside T cells. In addition, bacterial movement inside DC polarizing toward the IS could be somehow driven by the DC itself. For example, in [Movie S5](#), bacteria seem to move toward contacting T cell using the same pathway inside the infected DC. However, bacterial transinfection by MyD88 KO DCs shows no difference compared to that observed in WT DCs ([Figure S6D](#)), indicating that DCs PRRs do not seem to play any role in bacterial transinfection.

Our data clearly show that CD4⁺ T cells eliminate the uptaken bacteria, opposite to what was previously described, showing that lymphocytes could be a reservoir for bacteria ([McElroy et al., 2009](#)). These apparent contradictory data can be explained by the fact that the authors do not distinguish between T and B cells, while in our study we focused mainly in the role of CD4⁺ T cells. In addition, as occurs with professional phagocytes, not all the bacteria are destroyed. Our findings also open the field for future research regarding the mechanisms used by T cells to eliminate intracellular pathogens as well as the possible mechanisms employed by bacteria to avoid their killing. It is also very intriguing that bacteria like *L. monocytogenes* possess several putative virulence factors with unknown functions and with unknown time-programming and localization expression patterns during the course of an infection ([Cossart, 2011](#)). A full comprehension of this phenomenon would be necessary to evaluate the bacterial expression pattern during hosting inside T cells, and to analyze whether bacteria develop mechanisms to survive inside T cells.

This manuscript shows cryo-SXT images in bacteria-host interaction. Due to the size of the bacteria, these high-resolution,

nonstandardized technology results are especially useful in these studies. Cryo-SXT is capable of imaging cellular organization and locating subcellular structures in whole, hydrated cells, thus eliminating the artifacts from embedding, dehydration, and sectioning, and allowing the in situ imaging of whole cells ([Schneider et al., 2010](#)). In [Movie S8](#), a 3D reconstruction from a tomogram acquired at the synchrotron ALBA, we can appreciate the subcellular structures like the *Salmonella*-containing vacuole (SCV).

In sum, this work discovered roles for T cells during the course of bacterial infections and paved the way for future research in the field of T cell-pathogen interactions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains

The bacterial strains used were *Listeria monocytogenes* (EGD; BUG600), *L. monocytogenes* cGFP (BUG2539) ([Balestrino et al., 2010](#)), *L. monocytogenes*-OVA (pPL2-LLO-OVA), a *Listeria* strain expressing OVA protein in bacterial surface ([Pope et al., 2001](#)), its WT isogenic strain *L. monocytogenes* 10403S. *Salmonella enterica* sv *enteritidis* 3934, *S. enterica*/pGFPmut3, *Staphylococcus aureus* 132, *S. aureus*/pCN47-GFP, *S. aureus* 132 Δ srt (mutant in sortase and therefore nonpathogenic) ([Charpentier et al., 2004](#); [Cormack et al., 1996](#); [Solano et al., 2002](#); [Vergara-Irigaray et al., 2009](#)), *Escherichia coli* DH5 α , and *E. coli* DH5 α /pGFPmut3. Bacteria were grown in BHI (*Listeria* and *Staphylococcus*), or LB (*E. coli* and *S. enterica*). When necessary, 10 μ g/ml of erythromycin or 100 μ g/ml of ampicillin was added.

Mice

Wild-type C57BL/6 mice, C57BL/6-Tg (*Tcratcrb*)425Cbn/J OTII mice expressing a T cell receptor (TCR) specific for peptide 323–339 of OVA in

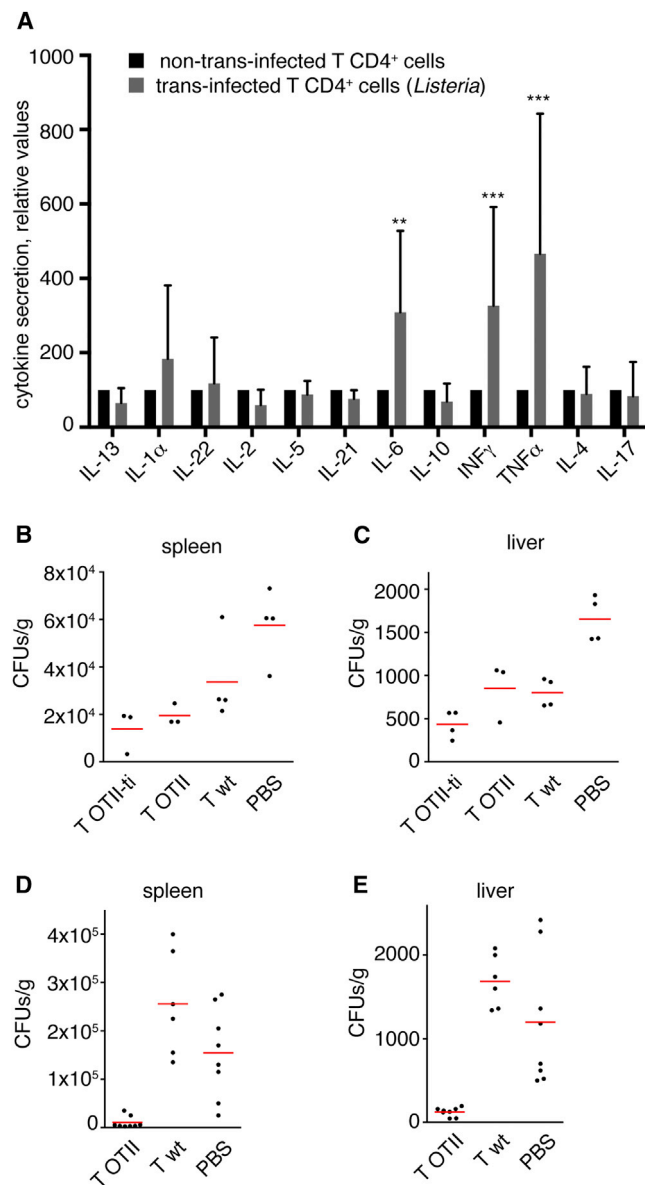


Figure 7. Transinfected T CD4⁺ Cells Secrete More Proinflammatory Cytokines than Nontransfected Ones

(A) CD4⁺ T cells were activated by OVA-loaded DCs and transinfected with *L. monocytogenes*. CD4⁺ T cells were then reisolated and activated for 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Extracellular cytokines were detected by flow cytometry using antibody-coupled beads. The data represent relative values respect to nontransfected T cells.

(B–E) Wild-type (wt) mice were inoculated intravenously with CD4⁺ T cells isolated from OT-II mice, from WT mice, or with PBS. In (B) and (C), OT-II CD4⁺ T cells transinfected with *Listeria*-OVA were also inoculated. Twenty-four hours after T cells inoculation, mice were challenged with *Listeria*-OVA. Twenty-four hours (B and C) or 48 hr (D and E) after bacterial challenge, mice were sacrificed, and the bacterial load in spleen and liver was detected by CFU counting.

the context of I-A^b, and C57BL/6-Tg(*Tcratcrb*)1100Mjb/J OTI mice expressing TCR specific for peptide 257–264 of OVA in the context of H2Kb were purchased from Jackson Laboratory (stock number 004194 and 003831, respectively). Either male or female mice aged between 8 and 12 weeks

were used for the experiments. Mice were kept in pathogen-free conditions at the Animal Unit of the School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid. Experimental procedures were approved by the Committee for Research Ethics of the Universidad Autónoma de Madrid and conducted under the supervision of the Universidad Autónoma de Madrid Head of Animal Welfare and Health in accordance with Spanish and European guidelines. Femurs from MyD88 KO mice and its isogenic C57BL/6 were provided by Bernhard Ryffel (CNRS Orleans, France).

Primary Cells and Cell Lines

Mouse Cells

DCs (mDCS) were generated according to the basic method of Inaba et al. (1992) with some modifications. Briefly, bone marrow was flushed from the tibias and femurs of 8- to 20-week-old C57BL/6 mice. Red blood cells were lysed, and the cell suspension was washed and filtered to remove debris. Bone marrow cells were seeded in P150 plates at a concentration of $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal serum (FCS), glutamine (2 mM), 2ME ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$), and GM-CSF (20 ng/ml). Fresh medium with GM-CSF was replaced at days 3, 6, and 9. Phenotypic characteristics of these cells were assessed by flow cytometry on day 10 (CD11c⁺, IA/IE⁺, and Gr1⁺) to ensure correct differentiation. Maturation was induced with 20 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) for 24 hr.

Primary mouse CD4⁺ T cells were obtained from single-cell suspensions of lymph nodes (LN) from OTII mice. Cell suspensions were incubated with biotinylated antibodies against CD8, IgM, B220, CD19, MHC class II (I-Ab), CD11b, CD11c, and DX5 and subsequently with streptavidin microbeads. CD4⁺ T cells were negatively selected in auto-MACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. To isolate CD8⁺ T cells from OT-I mice, cell suspensions of lymph nodes were incubated with the same biotinylated antibodies, but instead of CD8, CD4 antibody was used.

Human Cells

Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by a 30 min adherence step at 37°C in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum. Monocytes were immediately subjected to the DC differentiation protocol, as described (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Briefly, monocytes were cultured in RPMI, 10% FCS containing IL-4 (500 U/ml) and GM-CSF (500 U/ml). Cells were cultured for 6 days, with cytokine readdition every 48 hr, to obtain a population of immature hDCs. Phenotypic characteristics of these cells were assessed by flow cytometry on day 6 (HLA-DR⁺, CD3⁺, DC-SIGN⁺ CD14⁺ CD1a⁺). Maturation was induced with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 24 hr.

Peripheral blood lymphocytes were isolated from PBMCs by two rounds of plastic adherence. Human enriched V β 8⁺ T lymphoblasts were obtained from 7 day culture with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ staphylococcal enterotoxin E-stimulated peripheral blood lymphocytes. Studies were performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and were approved by the local Ethics Committee for Basic Research; informed consent was obtained from all human volunteers.

Cells Lines

CEM CCL-119 (human T cell lymphoblast-like cell line) were cultured in complete medium (RPMI 1640 and 10% FCS). HeLa CCL-2 were cultured in complete medium (DMEM and 10% FCS).

Antibodies and Reagents

Antibodies Recognizing Mouse Proteins

Antibodies recognizing mouse proteins included anti-CD11c, IA/IE, Gr1 (BD); biotinylated antibodies against CD3, CD4, CD8, CD28, IgM, B220, CD19, MHC class II (I-Ab), CD11b, CD11c DX5, and CD16/CD32 (BD); and anti-tubulin FITC-conjugated (Sigma). Anti-LFA-1 M17/4 and anti-CD3 were described previously (Sanchez-Madrid et al., 1983).

Antibodies Recognizing Human Proteins

Antibodies recognizing human proteins included anti-HLA-DR, anti-CD3, anti-CD1a, anti-DC-SIGN, anti-CD14, TCR chain $\nu\beta$ 8 (BD), biotinylated DC-SIGN and CD1a (Miltenyi Biotec), LFA-1 β subunit (CD18) Lia 3/2 mAb, and CD43 (HP2/21) (Sánchez-Mateos et al., 1995; Serrador et al., 1998). Anti-DC-SIGN-alexa 647 conjugated was from AbD Serotec.

Antibodies Recognizing Bacteria

Antibodies recognizing bacteria included anti-*S. enterica*, anti-*S. aureus*, and anti-*L. monocytogenes* (ABD Serotec).

Other Reagents

OVAp (OVA 323-339; I S Q A V H A A H A E I N E A G R, and OVA 257-264; S I I N F E K L) were generated in the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-CSIC, Staphylococcal Enterotoxin E (SEE, Toxin Technologies), mouse GM-CSF (Peprotech), human GM-CSF (Agrenvec), human IL-4 (R&D Systems), LPS (Sigma-Aldrich), streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec), and Alexa Fluor 568-Phalloidin (Invitrogen). Secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 488, 647, and 568 (Invitrogen). Secondary antibodies conjugated to PE (BD), Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich), cell tracker chloromethyl aminocoumarin (CMAC; Invitrogen), FluoSpheres biotin-labeled fluorescent (yellow-green fluorescent) microspheres 1 μ m diameter (Invitrogen), fluorescently tagged streptavidin (Invitrogen). Ammonium chloride (NH_4Cl) and 1400W (Sigma-Aldrich), pepstatin A; manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP); N-acetylcysteine (NAC); and L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) were gifts from Prof. J. Serrador, J.L. Rodríguez, and M. Ortiz de Landazuri.

Gentamicin Survival Assay

To determine the number of bacteria entering the cells, we followed the method described by Pizarro-Cerda and Cossart (2010), with some modifications. The indicated cells were infected with bacteria at moi of 10 for 1 hr at 37°C. After infections, 100 μ g/ml of gentamicin was added, and samples were incubated for an additional 1 hr at 37°C (in the case of *E. coli* 200 μ g/ml of gentamicin were used). Then, infected cells were washed with PBS to remove the antibiotic, counted, and lysed with 0.05% Triton X-100 (Sigma) in distilled water. Dilutions were seeded in LB (*Salmonella*) or BHI (*Staphylococcus* and *Listeria*) agar plates. CFUs were counted.

DC-T Cell Conjugate Formation

mDCs and hDCs were loaded with 10 μ g/ml OVAp and 1 μ g/ml SEE, respectively, and infected with bacteria for 1 hr. After extensive washing with PBS, infected DCs were coincubated with CD4⁺ T cells from transgenic OTII mice or human enriched-V β 8⁺ T lymphoblasts.

Immunofluorescence Microscopy

DC-T cell conjugates were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Samples were blocked with anti-mouse-CD16/CD32 monoclonal antibody (2.5 μ g/ml) for 15 min in the case of mouse samples or human γ -globulin (100 μ g/ml) in the case of human cells. After permeabilization (0.1% Triton X-100 in PBS), bacteria were detected by using specific antibodies or by its GFP expression. Depending on the experiment, DCs or T cells were marked with cell tracker chloromethyl aminocoumarin (CMAC). F-actin was detected using fluorescently tagged phalloidin. Samples were visualized by confocal microscopy using a Leica TCS-SP5 microscope equipped with 63 \times lens and controlled by Leica LAS AF. The images were analyzed with ImageJ (1.47; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Live-Cell Imaging

DCs were infected with GFP-expressing bacteria before conjugate formation. Infected DCs were resuspended in HBSS containing 2% FCS and seeded in glass-bottomed dish previously covered with poly-L-lysine. Then samples were coincubated with CD4⁺ T cells from transgenic OTII mice or human enriched-V β 8⁺ T lymphoblasts, which were marked with CMAC. Conjugate formation was followed by fluorescence microscopy using a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) with a 63 \times objective, illuminated with LEDs (CoolLed pE excitation system; CoolLed) and controlled by Leica MM AF (powered by Metamorph). Temperature (37°C) and CO₂ concentration (5%) were maintained stable during the image acquisition using Tempcontol 37-2 and CTI-controller 3700 (Leica).

Cryo-SXT

DC-T cell conjugates were seeded on gold quantifoil R 2/2 holey film microscopy grids (Au-HZB2 and Au-G200F1) coated with poly-L-lysine for 30 min. Samples were vitrified by plunge freezing. Vitrified grids were transfer to U41-TXM (HZB-BESSYII) (Schneider et al., 2012) and Mistral (ALBA-Light Source) (Pereiro et al., 2009) beamlines in BESSY II and ALBA synchrotron, respectively. The acquisition scheme was similar in both microscopes, using

X-rays with 510 eV and 520 photon energy, respectively, and X-ray projections taken at liquid nitrogen temperature with 1° tilt steps. The zone plate objectives of both microscopes have an outermost zone width of 40 nm; alignment reconstruction and segmentation were performed as described in Chichón et al. (2012).

Bacteria Transinfection Assays

DC-T cell conjugate formation was performed in the presence (or absence) of polycarbonate filter-containing chambers of 3 μ m pore size (Costar), with T cells in the bottom and infected DCs in the top of the chamber. As control, we also performed direct infections (moi = 10) of T cells. After 30 min of cell conjugates, gentamicin (100 μ g/ml) was added for 1 hr, and then T cells were reisolated by a negative selection in auto-MACS Pro Separator. Cell purity was checked by flow cytometry. Infections of T cells and DC were assessed by classical gentamicin survival assays. CFUs corresponding to low DC contamination were subtracted. Only experiments with T cell purity >97% were taken into account. When indicated, CD4⁺ T cells from OT-II mice were activated O/N with antigen-loaded APCs. Antibodies against LFA-1 or isotype controls were added for 15 min at 37°C before conjugate formation when indicated. In experiments involving listeria-OVA, DCs were not loaded with OVAp, and infection was performed for 6 hr (to allow antigen presentation) before conjugate formation. Gentamicin was added after 3 hr to avoid bacterial replication in the medium.

Transinfection was also tested by flow cytometry. Mouse T cells were stained with CMAC to be discriminated with respect to DC cells, which were labeled with CD11c-PE. hDCs cells were stained with anti-DC-SIGN in contrast to T cells responding to SEE, which were labeled with anti-v β 8. Extracellular bacteria were detected with anti-*S. enterica*, anti-*S. aureus*, or anti-*L. monocytogenes* before fixation and permeabilization. Total bacteria (intracellular + extracellular) were detected by its GFP expression or by using antibodies after cellular permeabilization. Fluorochromes detecting extracellular bacteria were different than those marking total bacteria. Samples were then analyzed using a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences), and data were evaluated using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). The same approach was followed using fluorescent, biotin-labeled microspheres.

Cellular Aggregation Using Anti-CD43 Antibody

DC-T cell conjugates were incubated with mAb against CD43, a control mAb IgG, or with PBS for 30 min at 37°C. Then dithiothreitol (DTT; 100 mM) was added for 10 min to allow cell disaggregation, followed by extensive vortexing. Finally, CD4⁺ T cells were reisolated by negative selection, and CFUs were counted by gentamicin assay.

Analysis of Cytokine Production by Transinfected T Cells

OT-II T cells were mixed with infected or noninfected OVAp-loaded DCs (1:1 T cell/DC ratio) for 24 hr. After 24 hr conjugation, DCs were severely damaged by bacteria, contrary to T cells that resulted undamaged as revealed by propidium iodide and cell trace calcein violet (data not shown). Then CD4⁺ T cells were reisolated by negative selection and activated with 5 μ g/ml of anti-CD3 and 2 μ g/ml of anti-CD28 for 72 hr. Phorbol myristate acetate (PMA; 50 ng/ml) was added for 6 hr, and supernatants were collected for cytokine quantification. Extracellular cytokines were quantified by CBA.

Adoptive Transfer Experiments

Transinfected OT-II CD4⁺ T cells, noninfected OT-II CD4⁺ T cells, noninfected WT CD4⁺ T cells, or PBS (as a control) was injected i.v. into recipient WT mice. After 24 hr, mice were infected i.v. with *Listeria*-OVA (30 000 bacteria/mouse). Twenty-four or 48 hr after bacterial challenge, CFUs from spleen and liver were counted in agar plates.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. When analyzing more than two groups, we used one-way analysis of variance (ANOVA), and multiple mean comparisons were corrected with Tukey post-test. Student's t test was used when individual comparisons of the mean between two groups were performed. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Data are shown in column bars representing the mean \pm SD of at least three independent experiments unless otherwise indicated.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and eight movies and can be found with this article at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.006>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Professor Pascale Cossart, Professor Iñigo Lasa, Dr. Pilar Martín, Dr. Jose Luis Rodríguez, Professor Manuel Ortiz de Landazuri, Dr. Juan Serrador, Dr. Dirk Brockstedt, and Bernhard Ryffel for providing us reagents. We also appreciated help from Dr. Miguel Vicente-Manzanares, Dr. María Yáñez-Mo, Dr. Laura Díaz-Muñoz, Marta Ramírez-Huesca, Adrian Izquierdo-Martínez, Raquel García-Ferreras, Dr. Stephan Werner, Dr. Katja Henzler, Dr. Andrea Sorrentino, and Dr. Stefan Rehbein. We thank HZB and ALBA for the allocation of synchrotron radiation beamtimes. The research leading to these results has received funding from Spanish BFU2011-29450, BFU2011-29038, FIS 11/00128, and SAF2011-25834, the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under BioStruct-X (grant agreement number 283570).

Received: April 18, 2013

Revised: January 18, 2014

Accepted: March 16, 2014

Published: May 14, 2014

REFERENCES

- Balestrino, D., Hamon, M.A., Dortet, L., Nahori, M.A., Pizarro-Cerda, J., Alignani, D., Dussurget, O., Cossart, P., and Toledo-Arana, A. (2010). Single-cell techniques using chromosomally tagged fluorescent bacteria to study *Listeria monocytogenes* infection processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3625–3636.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40.
- Bregenholt, S., Berche, P., Brombacher, F., and Di Santo, J.P. (2001). Conventional alpha beta T cells are sufficient for innate and adaptive immunity against enteric *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **166**, 1871–1876.
- Calabia-Linares, C., Robles-Valero, J., de la Fuente, H., Perez-Martinez, M., Martín-Cofreces, N., Alfonso-Pérez, M., Gutierrez-Vázquez, C., Mittelbrunn, M., Ibiza, S., Urbano-Olmos, F.R., et al. (2011). Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *J. Cell Sci.* **124**, 820–830.
- Campanero, M.R., del Pozo, M.A., Arroyo, A.G., Sánchez-Mateos, P., Hernández-Caselles, T., Craig, A., Pulido, R., and Sánchez-Madrid, F. (1993). ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J. Cell Biol.* **123**, 1007–1016.
- Cemerski, S., and Shaw, A. (2006). Immune synapses in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 298–304.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004). Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6076–6085.
- Chichón, F.J., Rodríguez, M.J., Pereiro, E., Chiappi, M., Perdiguero, B., Guttman, P., Werner, S., Rehbein, S., Schneider, G., Esteban, M., and Carrascosa, J.L. (2012). Cryo X-ray nano-tomography of vaccinia virus infected cells. *J. Struct. Biol.* **177**, 202–211.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173** (1 Spec No), 33–38.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 19484–19491.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**, 242–248.
- Dai, W.J., Köhler, G., and Brombacher, F. (1997). Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* **158**, 2259–2267.
- Dustin, M.L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol. Rev.* **221**, 77–89.
- Ehlers, S., Mielke, M.E., Blankenstein, T., and Hahn, H. (1992). Kinetic analysis of cytokine gene expression in the livers of naive and immune mice infected with *Listeria monocytogenes*. The immediate early phase in innate resistance and acquired immunity. *J. Immunol.* **149**, 3016–3022.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duinhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587–597.
- Gomez, T.S., Hamann, M.J., McCarney, S., Savoy, D.N., Lubking, C.M., Heldebrandt, M.P., Labno, C.M., McKean, D.J., McNiven, M.A., Burkhardt, J.K., and Billadeau, D.D. (2005). Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat. Immunol.* **6**, 261–270.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693–1702.
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gómez, M., Erkizia, I., Puertas, M.C., Borrás, F.E., Blanco, J., and Martínez-Picado, J. (2010). HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog.* **6**, e1000740.
- Kaufmann, S.H., and Schaible, U.E. (2005). Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 79–87.
- McElroy, D.S., Ashley, T.J., and D'Orazio, S.E. (2009). Lymphocytes serve as a reservoir for *Listeria monocytogenes* growth during infection of mice. *Microb. Pathog.* **46**, 214–221.
- Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2012). Inter cellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 328–335.
- Müller, A.J., Filipe-Santos, O., Eberl, G., Aebischer, T., Späth, G.F., and Bousso, P. (2012). CD4+ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. *Immunity* **37**, 147–157.
- Nakane, A., Numata, A., and Minagawa, T. (1992). Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect. Immun.* **60**, 523–528.
- Niedergang, F., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (1998). Cooperative activation of TCRs by enterotoxin superantigens. *J. Immunol.* **161**, 6054–6058.
- Oykhman, P., and Mody, C.H. (2010). Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 249482.
- Pereiro, E., Nicolás, J., Ferrer, S., and Howells, M.R. (2009). A soft X-ray beam-line for transmission X-ray microscopy at ALBA. *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 505–512.
- Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes*: techniques to analyze bacterial infection in vitro. In *Cell Biology Assays: Essential Methods*, G. Kreitzer, J. Fanny, and C. Espenel, eds. (New York: Elsevier), pp. 261–272.
- Pope, C., Kim, S.K., Marzo, A., Masopust, D., Williams, K., Jiang, J., Shen, H., and Lefrançois, L. (2001). Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **166**, 3402–3409.
- Reichardt, P., Dornbach, B., and Gunzer, M. (2010). APC, T cells, and the immune synapse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **340**, 229–249.
- Saito, T., and Batista, F.D. (2010). *Immunological Synapse*. (New York: Springer).
- Salgado-Pabón, W., Celli, S., Arena, E.T., Nothelfer, K., Roux, P., Sellge, G., Frigimelica, E., Bousso, P., Sansonetti, P.J., and Phalipon, A. (2013). *Shigella* impairs T lymphocyte dynamics in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 4458–4463.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–1118.

- Sanchez-Madrid, F., Simon, P., Thompson, S., and Springer, T.A. (1983). Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1. *J. Exp. Med.* 158, 586–602.
- Sánchez-Mateos, P., Campanero, M.R., del Pozo, M.A., and Sánchez-Madrid, F. (1995). Regulatory role of CD43 leukosialin on integrin-mediated T-cell adhesion to endothelial and extracellular matrix ligands and its polar redistribution to a cellular uropod. *Blood* 86, 2228–2239.
- Schneider, G., Guttman, P., Heim, S., Rehbein, S., Mueller, F., Nagashima, K., Heymann, J.B., Müller, W.G., and McNally, J.G. (2010). Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy. *Nat. Methods* 7, 985–987.
- Schneider, G., Guttman, P., Rehbein, S., Werner, S., and Follath, R. (2012). Cryo X-ray microscope with flat sample geometry for correlative fluorescence and nanoscale tomographic imaging. *J. Struct. Biol.* 177, 212–223.
- Serrador, J.M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., González-Amaro, R., Sánchez-Mateos, P., and Sánchez-Madrid, F. (1998). CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91, 4632–4644.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43, 793–808.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271–296.
- Ueda, H., Morphew, M.K., McIntosh, J.R., and Davis, M.M. (2011). CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 17099–17104.
- Vaudaux, P., and Waldvogel, F.A. (1979). Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 743–749.
- Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de Los Mozos, I., Solano, C., Toledo-Arana, A., Penadés, J.R., and Lasa, I. (2009). Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect. Immun.* 77, 3978–3991.
- Waite, J.C., Leiner, I., Lauer, P., Rae, C.S., Barbet, G., Zheng, H., Portnoy, D.A., Pamer, E.G., and Dustin, M.L. (2011). Dynamic imaging of the effector immune response to *listeria* infection in vivo. *PLoS Pathog.* 7, e1001326.

Supplemental Information

T Cells Kill Bacteria Captured by Trans-Infection from Dendritic Cells and Confer Protection in Mice

Aránzazu Cruz-Adalia, Guillermo Ramirez-Santiago, Carmen Calabia-Linares, Mónica Torres-Torresano, Lidia Feo, Marta Galán-Díez, Elena Fernández-Ruiz, Eva Pereiro, Peter Guttmann, Michele Chiappi, Gerd Schneider, José López Carrascosa, Francisco Javier Chichón, Gloria Martínez del Hoyo, Francisco Sánchez-Madrid, and Esteban Veiga

Supplementary material

Supplementary Figures and movies:

Fig. S1. Bacteria localized at the IS, related to Fig. 2. Confocal images of antigen-loaded DCs infected with the indicated bacteria (red) co-incubated during 30 min with non-infected primary T cells. Actin is shown in cyan and CD3 or tubulin is shown in grey. In panels (A-B) mDCs (non stained) and mouse CD4⁺ T cells (blue) are shown. In panels (C-D) human T lymphoblasts are shown non-stained (C) and blue (D). hDCs are shown in blue (C) or not stained (D). Bars represent 10 μ m. *Staph* indicates *Staphylococcus aureus*.

Fig. S2. Dynamics of bacteria during trans-infection, related to Fig. 2. Bacteria localized at the DC-(A) Combination of fluorescence and phase contrast images showing *L. monocytogenes*-GFP (green) associated with a mDC (non stained) near a contacting mouse CD4⁺ T cell (blue). This image corresponds to Movie S2. (B) Combination of fluorescence and phase contrast images showing in the first square a hDC (not stained) surrounded by human T lymphoblasts (blue, stained with CMAC). The rest of the figure show acquisition frames from of Movie S4, with *S. enterica*-GFP in green. We can also observe a dead DC (autofluorescent) in the upper left corner of the images. (C) Live-cell time series showing the contact between a hDC infected with *S. enterica*-GFP (green) and loaded with SEE and a human T lymphoblast (blue in the last square). The figure shows acquisition frames from Movie S3. (D) Live-cell time series showing the contact between a mDC infected with *L. monocytogenes*-GFP (green) and loaded with OVAp and a CD4⁺ T cell from OT-II mouse (blue in the last

square). The figure shows acquisition frames from Movie S5. (E-G) Confocal images of infected hDCs (non-stained (E), and stained in blue (F,G). The indicated bacteria are shown in red, actin is shown in cyan and T lymphoblasts are shown in blue in E, and non-stained in F and G.

Fig. S3. (A) Scheme of the bacterial trans-infection assay, related to Fig 3 and 4. We first obtained T cells and DCs either from mouse or human origin. DCs were loaded (or not) with antigen recognized by T cell and infected with bacteria, then, DCs were co-incubated with non-infected T cells. The co-incubation can allow the direct contact of T cells and DCs (- TW) or can be done in presence of a physical barrier (polycarbonate filter-containing chambers; + TW) impeding direct contact between DCs and T cells. We also performed direct infections of T cells. Cells were separated by vortexing, T cells were then re-isolated. Intracellular bacteria were quantified by typical gentamicin survival assay. (B) Representative experiment using human cells and analysed by flow cytometry. DC and T cell populations can be distinguished by size and complexity, as well as by using antibodies. DC population are DC-SIGN + whereas T lymphoblasts were DC-SIGN -. We analysed the population of T lymphoblasts positive for $V\beta 8^+$, thus their TCRs respond to SEE. Within this population we distinguished the T lymphoblasts containing intracellular bacteria (non marked with the anti-bacterial antibody added before permeabilization) from T lymphoblasts containing extracellular bacteria.

Fig. S4. Controls related to Figs. 3, 4 and 5. (A) The presence of the antigen (OVAp) does not interfere with the bacterial association to mDC. mDCs were loaded (or not) with OVAp and infected with the indicated bacteria. Column bars represent the rate of DCs associated with bacteria analyzed by flow cytometry. Column bars represent the

mean of at least 3 independent experiments. Error bars indicate the SD. No significant differences were observed. (B) OVAp-loaded, *Salmonella*-infected DCs were co-incubated with activated CD4⁺ T cells or non-activated CD4⁺ T cells. Bacterial trans-infection was measured by gentamicin survival assay and represented as relative values respect non-activated T cells. (C) mDC were loaded (or not) with OVAp (OVA) and infected with non-pathogenic *E. coli*, followed by co-incubation with OT-II CD4⁺ T cells or in the presence or not of a polycarbonate barrier (transwell). After conjugate formation, T cells were re-isolated and classical gentamicin survival assays was performed. Colony forming units (CFUs) were counted, and it is shown the number of CFUs corresponding to 50 000 CD4⁺ T cells. θ indicates direct infection of bacteria in T cells. (D) *Listeria*-infected hDCs were cultured with human T lymphoblasts in the presence of aggregative anti-CD43 antibody, control isotype IgG, or PBS. T cells trans-infection was measured by gentamicin survival assay after T cell re-isolation. (E) hDC were loaded (or not) with SEE and infected with non-pathogenic *S. aureus* Δ srt, followed by co-incubation with human T lymphoblasts enriched in $\nu\beta 8^+$ TCR in the presence or not of a polycarbonate barrier (transwell). After conjugate formation, T cells were re-isolated and classical gentamicin survival assays was performed. Colony forming units (CFUs) were counted, and it is shown the number of CFUs corresponding to 50 000 CD4⁺ T cells. θ indicates direct infection of bacteria in T cells. (F) Fluorescent microspheres associated even better than bacteria to mDCs. mDCs were loaded with OVAp and incubated with the indicated bacteria or fluorescent microspheres (beads) at 10:1 (bacteria/beads: DC) ratio. It is shown the rate of DCs associated with beads/bacteria as analyzed by flow cytometry. Column bars represent the mean of at least 3 independent experiments. Error bars indicate the SD.

Fig. S5 Representative experiment of bacterial transfer to T cells treated with cytochalasin D, related to Fig. 5. OVAp-loaded and *S. enterica*-infected mDC were co-incubated with murine CD4⁺ T cells (from OT-II mice) that have been treated with cytochalasin D, DMSO (the solvent of cytochalasin) or untreated. The figure shows the flow cytometer analysis gating in CMAC⁺ staining cells corresponding to T cell population. T cells harbouring extracellular bacteria appeared in the upper right quadrant, whereas T cells harbouring intracellular bacteria appeared in the lower right quadrant. Cytochalasin D treatment reduces the rate of infected T cells.

Fig. S6. (A) Scheme of the assay dissecting whether T cells capture bacteria from the inside (intracellular transfer) or associated to the surface of the DCs (extracellular transfer) related to Fig 5E. After bacterial infection of mDCs, gentamicin was added to kill extracellular bacteria (condition 1 and 2). In condition 1 gentamicin was also present during IS formation. In condition 2, before co-incubation with CD4⁺ T cells, gentamicin was washed out. In condition 3 no gentamicin was added. After conjugate formation, cells were separated by vortexing, T cells re-isolated and typical gentamicin survival assay was performed on T cells. (B) mDCs were infected with *L. monocytogenes* (wt) or its isogenic strain expressing OVA, *Listeria*-OVA. After 6 h, conjugate formation with CD4⁺ T cells from OT-II transgenic mice was allowed for 30 min. T cells were then re-isolated and bacterial trans-infection was measured by gentamicin survival assays. Results are shown as relative to *Listeria* wt condition. (C) Bacterial survival in mDCs vs CD4⁺ T cells. Intracellular bacteria from infected DCs or CD4⁺ T cells from OT-II mice (after trans-infection assays) were detected by gentamicin survival assays at different times. Data were normalized respect to what observed in time 0. (D) mDC from MyD88 KO mice or from their isogenic C57BL/6 wt

were matured O/N with Poly I/C (5µg/ml), stimulating TLR3. Mature mDC were loaded with OVAp and infected with the indicated bacteria followed by co-incubation with CD4⁺ T cells for 30 min. After conjugate formation, CD4⁺ T cells were re-isolated and classical gentamicin survival assays was performed. We did not detect any significant difference in bacterial trans-infection between wt and MyD88 KO DCs with the bacteria tested.

Movie S1. Time-lapse movie showing OVAp-loaded, *S. enterica*-GFP (green)-infected mDC contacting a CD4⁺ T cell. Related to Fig. 2. Images were acquired at approximately 5 seconds intervals. Time is shown in minutes and seconds, bar corresponds to 10 µm. In Fig. 2G. T cell is shown in blue. Images were acquired with a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) and analysed using Image J.

Movie S2. Time-lapse movie showing OVAp-loaded, *L. monocytogenes*-GFP (green)-infected mDC contacting a CD4⁺ T cell. Related to Fig. 2. Images were acquired at approximately 2 seconds intervals. Time is shown in minutes and seconds, bar corresponds to 10 µm. In Fig. S2A. T cell is shown in blue. Due to the photo bleaching, the signal of the green channel was increased at time point 05:20. Images were acquired with a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) and analysed using Image J.

Movie S3. Time-lapse movie showing SEE-loaded, *S. enterica*-GFP (green)-infected hDC contacting a T lymphoblast. Related to Fig. 2. Images were acquired at approximately 3 seconds intervals. Time is shown in minutes and seconds, bar corresponds to 10 µm. In Fig. S2C. T lymphoblast is shown in blue. Images were acquired with a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) and analysed using Image J.

Movie S4. Time-lapse movie showing SEE-loaded, *S. enterica*-GFP (green)-infected hDC contacting a T lymphoblast. Related to Fig. 2. Images were acquired at approximately 10 seconds intervals. Time is shown in minutes and seconds, bar corresponds to 10 μ m. In Fig. S2B. T lymphoblast is shown in blue. Images were acquired with a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) and analysed using Image J.

Movie S5. Time-lapse movie showing OVAp-loaded, *L. monocytogenes*-GFP (green)-infected mDC contacting a CD4⁺ T cell. Related to Fig. 2. Images were acquired at approximately 2 seconds intervals. Time is shown in minutes and seconds, bar corresponds to 10 μ m. In Fig. S2D. T cell is shown in blue. Images were acquired with a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) and analysed using Image J.

Movie S6. Three-dimensional rendering of confocal images showing *S. enterica* inside human T lymphoblast contacting a hDC (previously infected). Related to Fig. 2. The sample is the same shown in Fig. S2F. hDC cytoplasm is shown in grey, actin in cyan and bacterium in red. Here, it is also shown the CD3 of the T lymphoblast in green (right panel). It can be appreciated that bacterium is already inside T cell, near CD3 accumulation at the IS.

Movie S7. 3D reconstruction from the tomogram shown in Fig 2 (I-J). In the first part of the movie, the virtual slices of the tomogram are shown. Then, the DC (grays), T cell (cyan) and bacteria (red) are highlighted. Two bacteria present in the IS, one inside the DC, and the other being engulfed by the T cell are zoomed in. The nucleus of the T cells is also highlighted in blue.

Movie S8. 3D reconstruction from a tomogram, acquired at ALBA, shown a T cell contacting an infected DC. Related to Fig. 2. In the first part of the movie, the virtual slices of the tomogram are shown. Then, the DC (grays), T cell (cyan), *Salmonella* (red) and *Salmonella* containing vacuole (SCV; brown) are highlighted. Three bacteria present inside the DC near the T cell. The nucleus of the T cells is also highlighted in blue. T cell emits prolongations towards one of the SCV. There can be observed a large amount of internal vesicles in the DC, typical of dying DCs. Note that DCs are very sensitive to *Salmonella* infections.

Figure S1

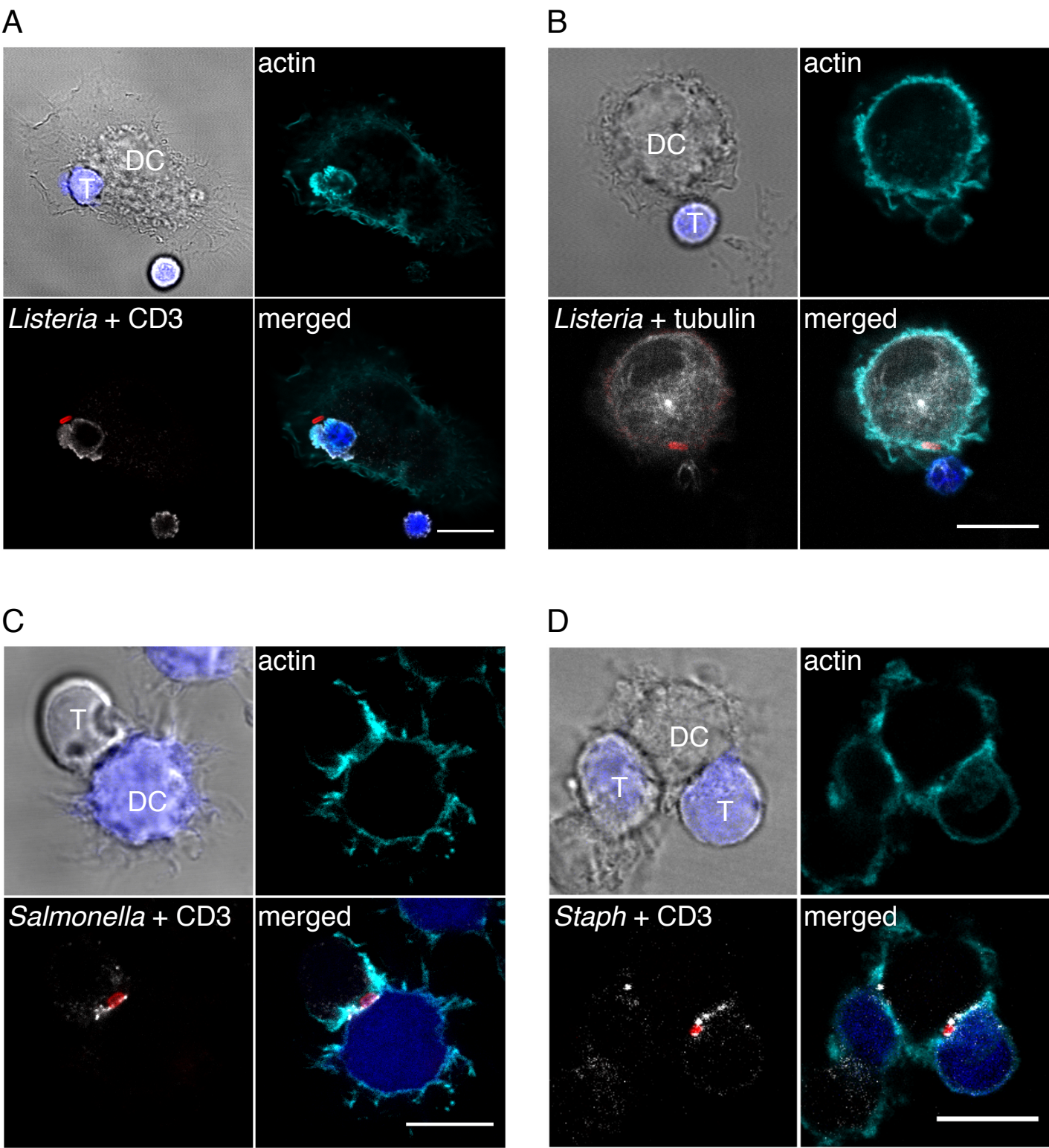
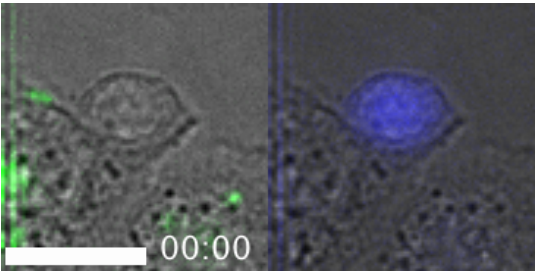
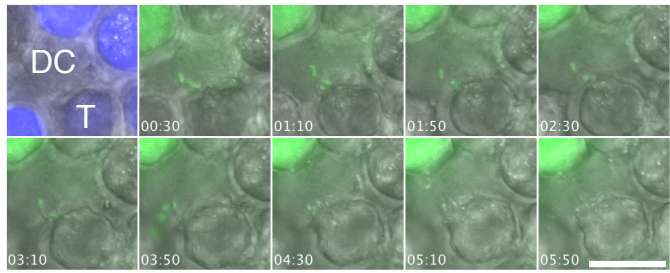


Figure S2

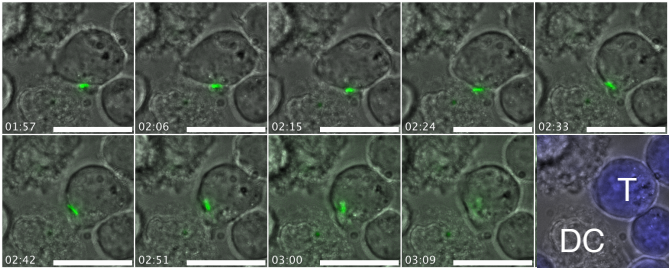
A



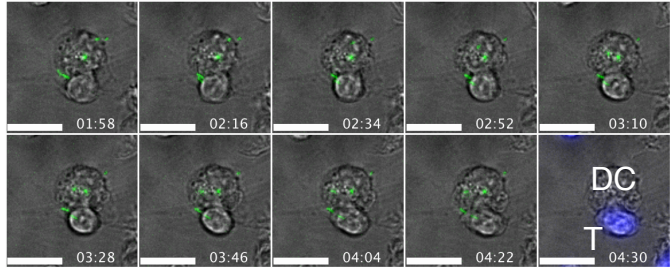
B



C

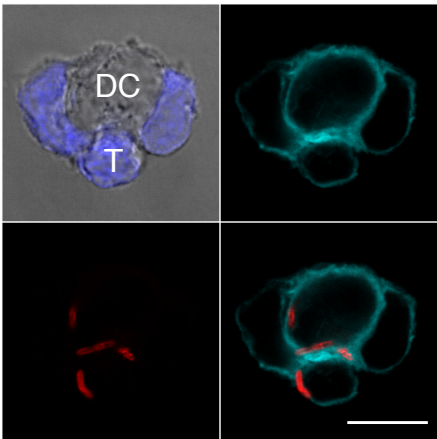


D



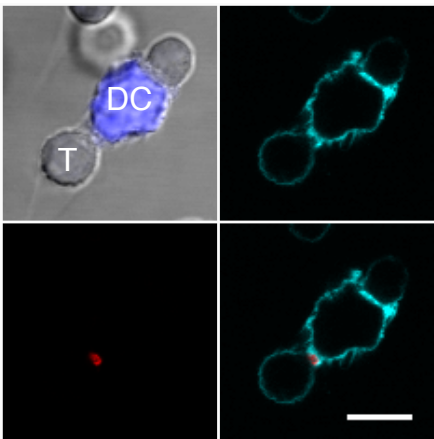
D

L. monocytogenes



E

S. enterica



F

S. aureus

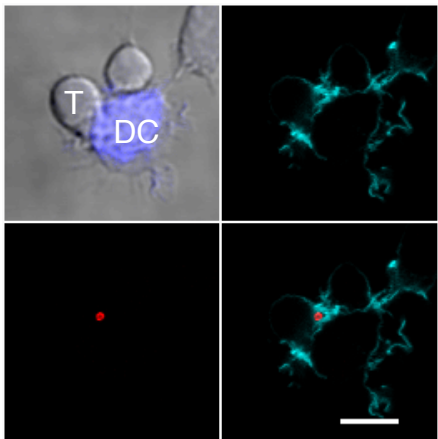
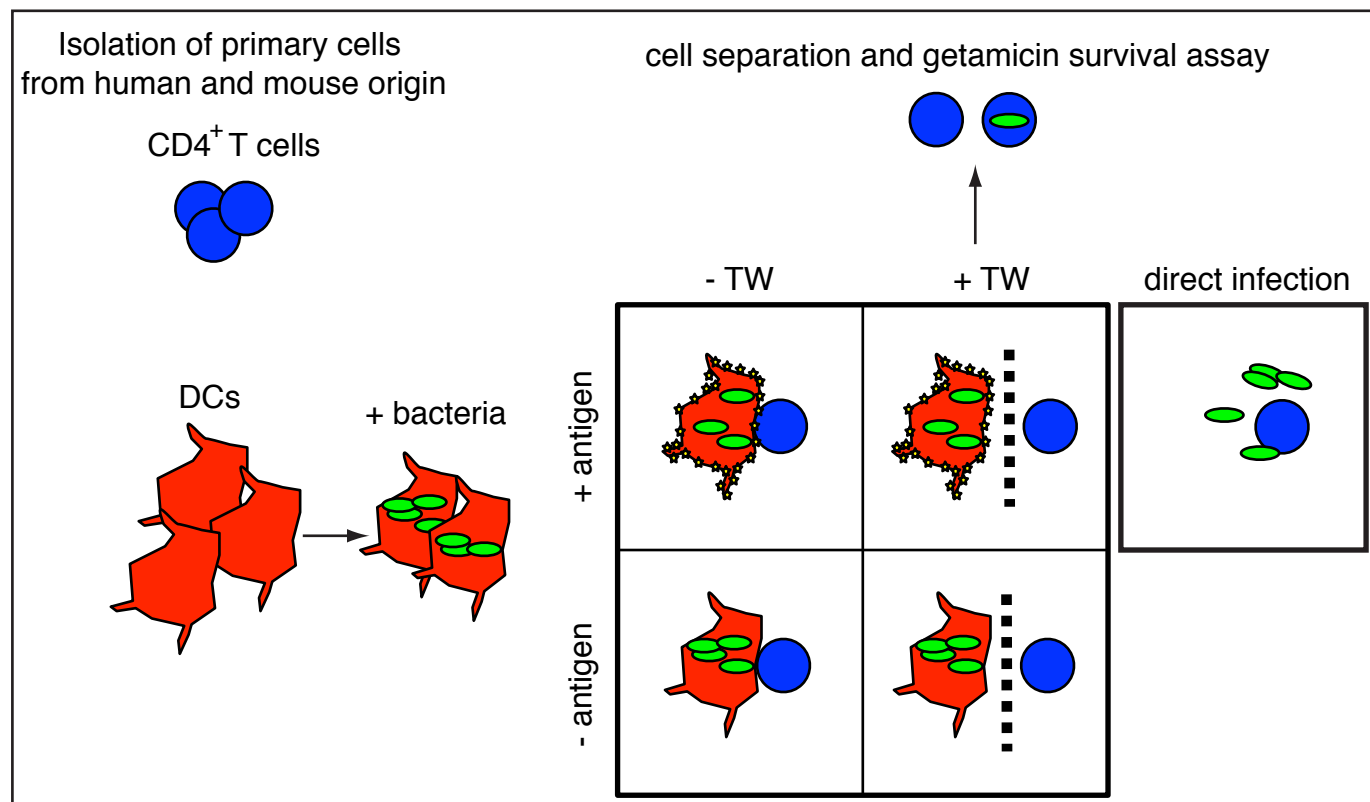


Figure S3

A



B

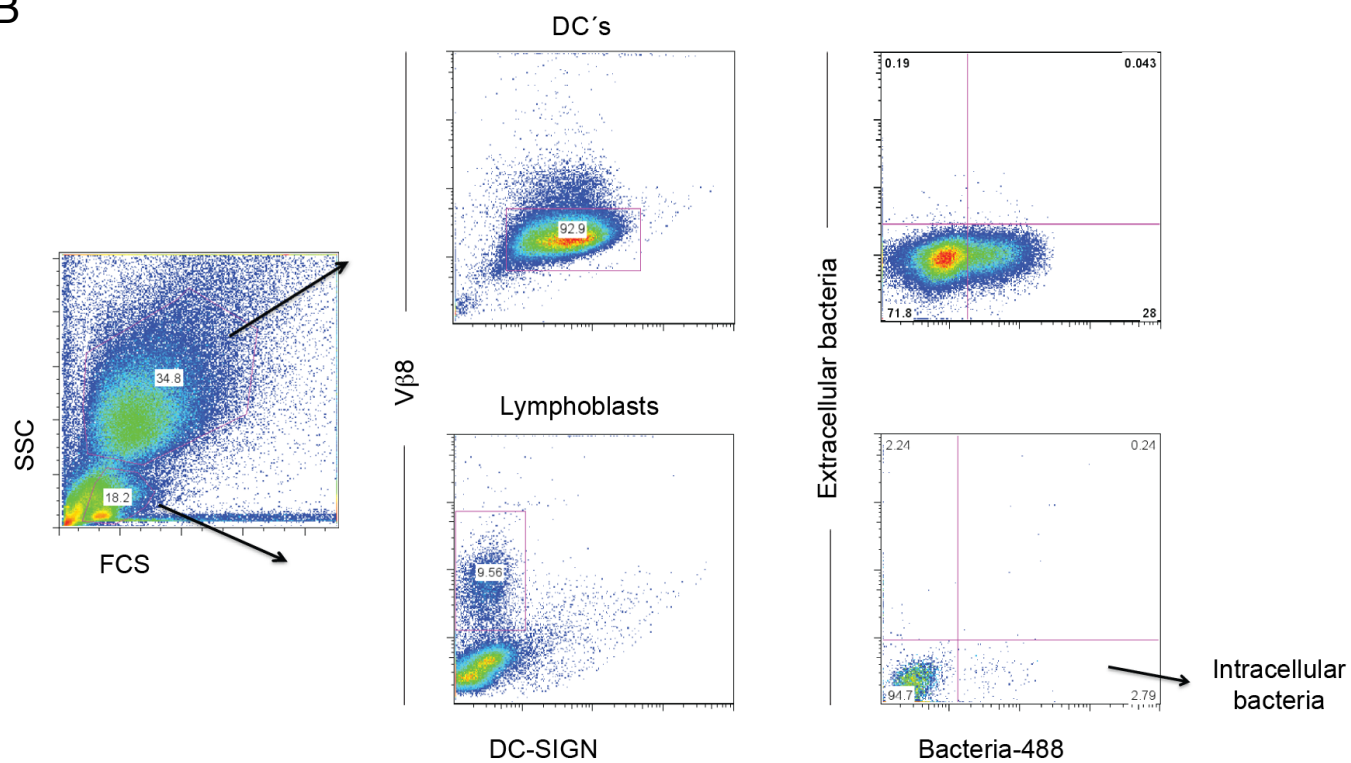


Figure S4

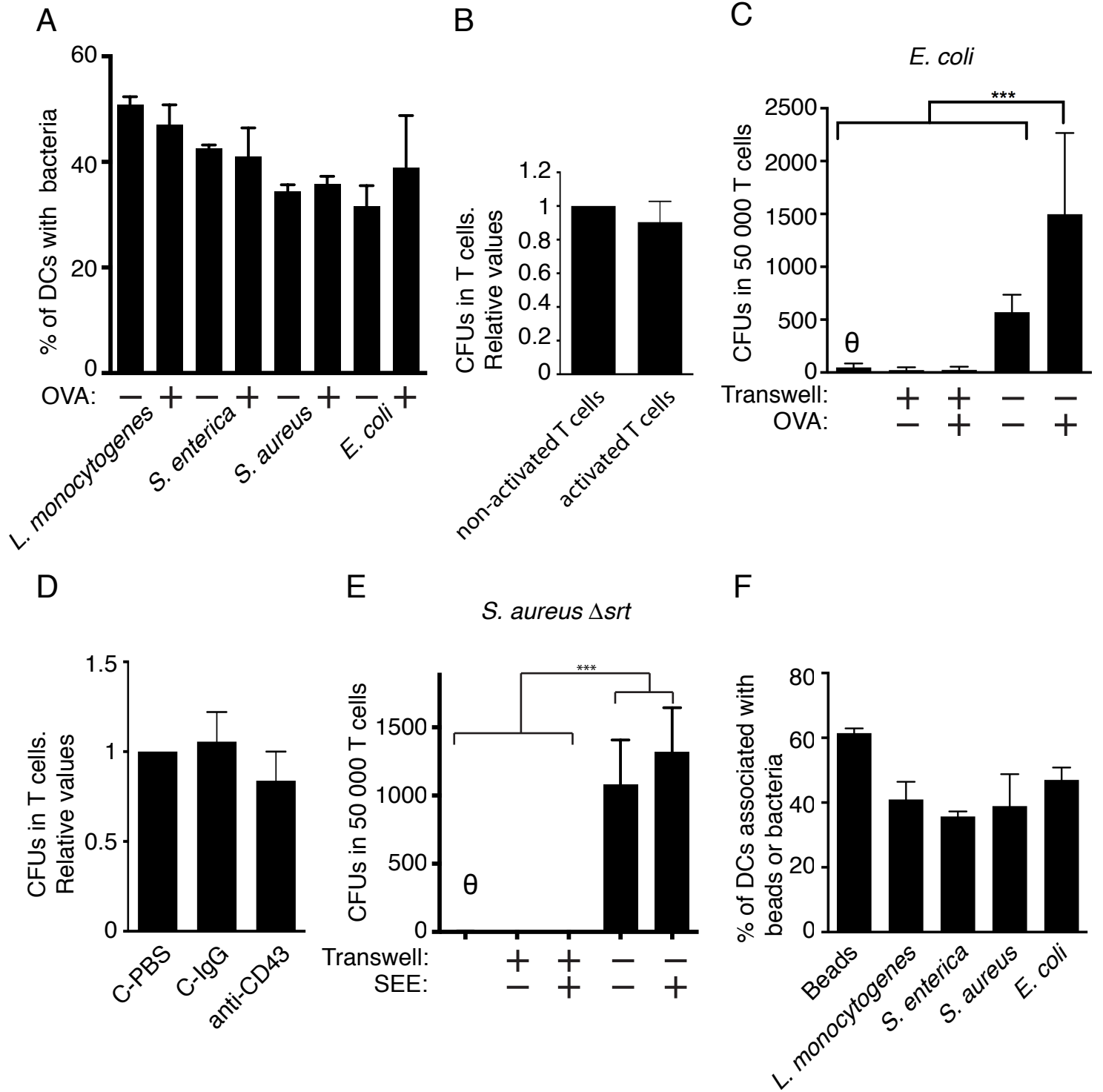


Figure S5

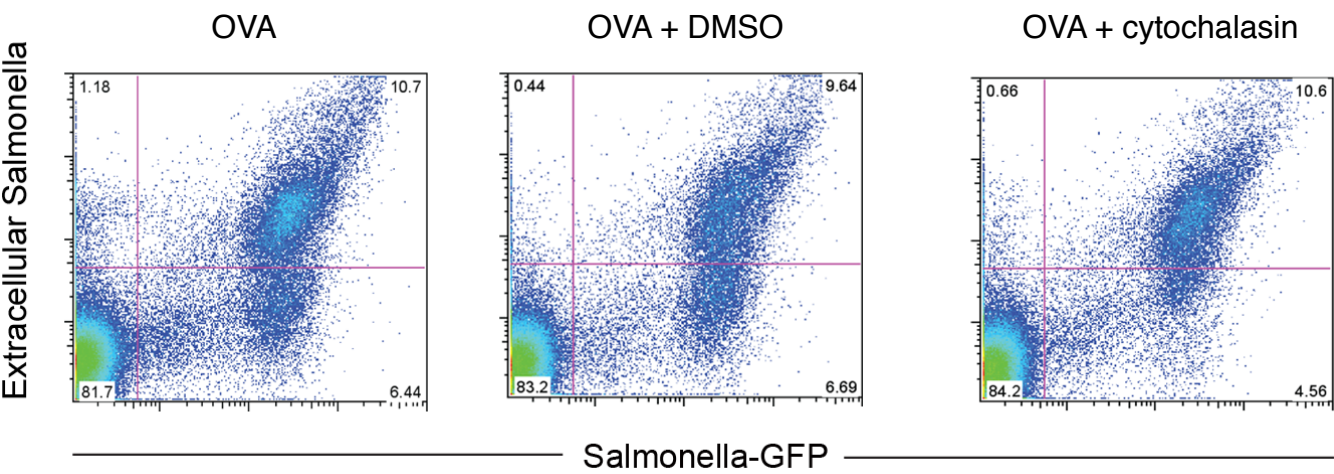
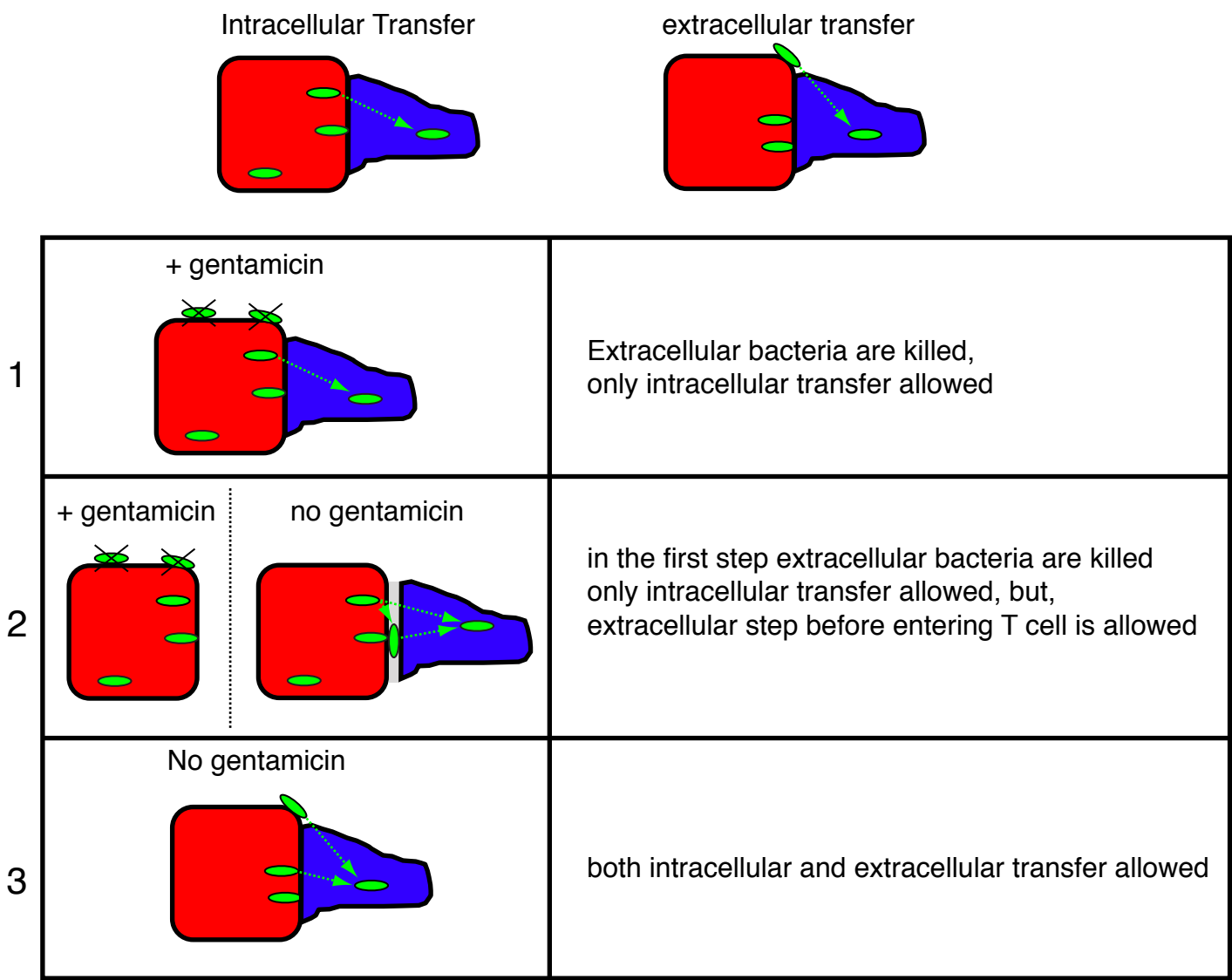
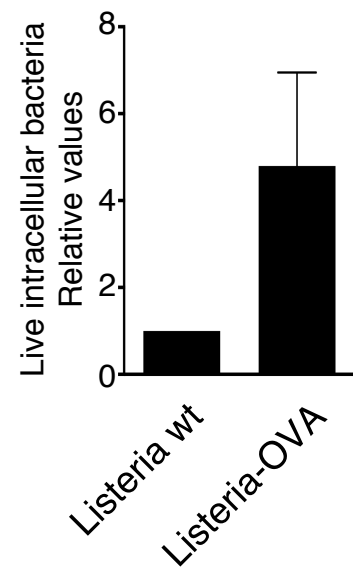


Figure S6

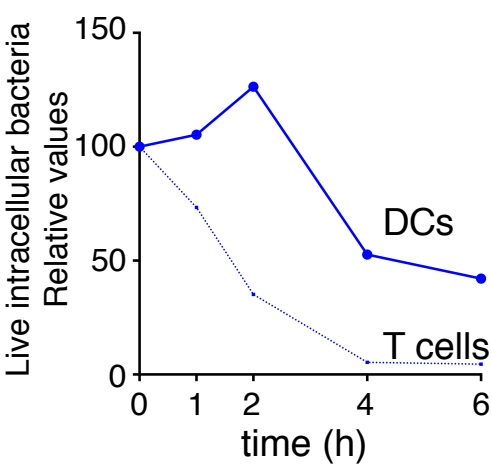
A



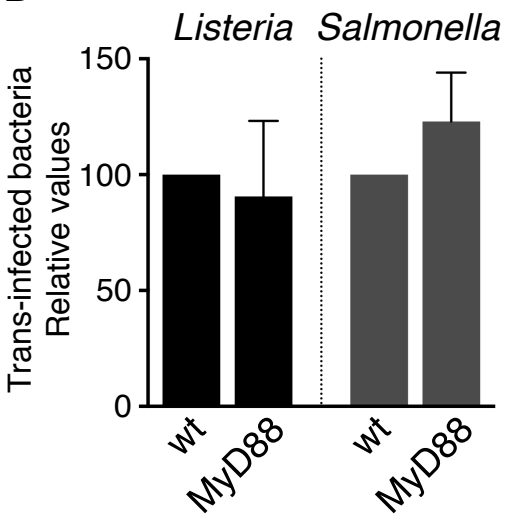
B



C



D



Research Article

Clathrin regulates lymphocyte migration by driving actin accumulation at the cellular leading edge

Guillermo Ramírez-Santiago^{1,2}, Javier Robles-Valero³, Giulia Morlino³, Aranzazu Cruz-Adalia^{1,2}, Manuel Pérez-Martínez⁴, Airen Zaldivar⁵, Mónica Torres-Torresano^{1,2}, Francisco Javier Chichón⁵, Andrea Sorrentino⁶, Eva Pereiro⁶, José L. Carrascosa^{5,7}, Diego Megías⁴, Carlos Oscar S. Sorzano⁵, Francisco Sánchez-Madrid³ and Esteban Veiga^{1,2}

¹ Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Department of Molecular & Cellular Biology, Madrid, Spain

² Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital de Santa Cristina, Madrid, Spain

³ Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain

⁴ Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain

⁵ Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Department of Macromolecular Structures, Madrid, Spain

⁶ ALBA Synchrotron Light Source, MISTRAL Beamline—Experiments Division, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

⁷ Unidad Asociada CNB (CSIC)-Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA Nanociencia), Cantoblanco, Madrid, Spain

Lymphocyte migration, which is essential for effective immune responses, belongs to the so-called amoeboid migration. The lymphocyte migration is up to 100 times faster than between mesenchymal and epithelial cell types. Migrating lymphocytes are highly polarized in three well-defined structural and functional zones: uropod, medial zone, and leading edge (LE). The actinomyosin-dependent driving force moves forward the uropod, whereas massive actin rearrangements protruding the cell membrane are observed at the LE. These actin rearrangements resemble those observed at the immunological synapse driven by clathrin, a protein normally involved in endocytic processes. Here, we used cell lines as well as primary lymphocytes to demonstrate that clathrin and clathrin adaptors colocalize with actin at the LE of migrating lymphocytes, but not in other cellular zones that accumulate both clathrin and actin. Moreover, clathrin and clathrin adaptors, including Hrs, the clathrin adaptor for multivesicular bodies, drive local actin accumulation at the LE. Clathrin recruitment at the LE resulted necessary for a complete cell polarization and further lymphocyte migration in both 2D and 3D migration models. Therefore, clathrin, including the clathrin population associated to internal vesicles, controls lymphocyte migration by regulating actin rearrangements occurring at the LE.

Keywords: Cellular immunology · Cytoskeleton · Lymphocyte migration



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Dr. Esteban Veiga
e-mail: eveiga@cnb.csic.es

Introduction

Lymphocyte migration to sites of infection or injury is essential for an effective immune response [1]. Contrary to the slow mesenchymal mode of migration defining by strong anchoring to the substrate, leukocytes (amoeboid) migration resembles that of the amoeba *Dictyostelium discoideum* [2], reaching speeds up to 100 times faster than mesenchymal and epithelial cell types [3]. Lymphocyte migration is driven by protrusion and contraction, and is defined by constant shape changes and cellular polarization in three well-defined zones; a very dynamic actin-rich leading edge (LE), a central cell body, and the uropod, which is the posterior tail [4]. The uropod, where there are located the mitochondria, provides the actin/myosin-dependent pushing force, whereas the branched actin networks formed at the LE push the plasma membrane protruding it outward. Interestingly, there exist increasing pieces of evidence showing that clathrin, extensively studied by its central role in endocytosis [5], has been associated during different biological processes involving local actin remodeling such as pathogen infections [6, 7], membrane invaginations [8], and lamellipodium formation [9] among others. Moreover, it has been shown that during antigen presentation, clathrin not only participates in the same events that requires actin remodeling, but drives itself local and massive actin accumulation observed in T cells contacting antigen-loaded antigen presenting cells [10].

Here, using up to date imaging technologies, and developing ad hoc image analysis software, we show that clathrin plays a pivotal role in actin remodeling observed at the LE of migrating cells during amoeboid migration. Clathrin recruitment to the cellular front resulted essential for a proper lymphocyte polarization and further migration. We also show that clathrin population involved in T-cell migration are linked to plasma membrane as well as to internal vesicles and we show these data using lymphoid cells lines as well as human primary T cells.

Results

To test the localization of clathrin, clathrin adaptors (clathrin bind to different cell membranes through interaction with proteins called clathrin adaptors [11, 12]), and actin in migrating lymphocytes, we used a model of 2D migration based in the human T-cell line CEM (C.E.M. are the initials of the child with acute lymphoblastic leukemia from whom the lymphocytes were isolated from peripheral blood and cultured) plated on glass cover slides in the presence of stromal cell derived factor 1 α (SDF-1 α). This model of chemokine-dependent migration has been previously used to study cellular migration [13, 14]. Cells were transfected with td-Tomato-LCa (clathrin light chain fused to td-Tomato) and GFP-actin and monitored by confocal microscope. Upon SDF-1 α addition, cells polarized, start migrating, and a clear accumulation of clathrin is observed not only at the uropod, where it was described to be [15], but also at the LE, mirroring actin (Supporting Information Movies 1 and 2). The presence of endogenous clathrin at the LE of migrating lymphocyte, together with actin (detected

using fluorescent Phalloidin), was confirmed by immunofluorescence using antibodies against clathrin heavy chain (Fig. 1A). We also analyzed the subcellular location of Hrs, the clathrin adaptor that connects clathrin with multivesicular bodies (MVBs), which has been shown to play a major role in actin accumulation at the immunological synapse (IS) [10] (Fig. 1B). Hrs accumulation paralleled that of clathrin, and can be detected together with actin in both the uropod and the LE of migrating T cells. Dynamin 2, a large GTPase that links clathrin and actin [16] and promotes actin polymerization at the IS [17], was also localized at the LE of migrating lymphocytes (Fig. 1C). To quantify the localization of these proteins, we performed colocalization analysis that showed that clathrin (Fig. 1D) and Hrs (Fig. 1E) colocalized with actin at the LE but not in the uropod, indicating that clathrin (and clathrin associated to internal vesicles) in the LE is linked to actin polymerization. A scheme indicating the different zones in which a migrating lymphocyte is divided, that is, LE, middle part of the cell, and uropod, is shown Figure 1F.

In order to follow the recruitment dynamics of clathrin-coated vesicles toward the LE, we performed live cell imaging of migrating lymphocytes. Lymphocytes were transfected with td-Tomato-LCa and monitored by epifluorescence microscope (Supporting Information Movie 3). Vesicle-tracking analysis shows that vesicles in the LE behave differently than those found in the uropod or in static cells (Fig. 2A–D), vesicle displacement length and directionality in the LE are compatible with actin-driven vesicle movement [18].

The ultrastructure of the LE of migrating lymphocytes was further assessed by cryo-soft-X-ray tomography, a novel technology that allows to visualize cellular organization at high resolution in a hydrated state the whole cells, avoiding embedding, dehydration, and sectioning artifacts [19]. A tomogram reconstruction of migrating lymphocyte can be observed in Figure 2E–G. Mitochondria, the microtubule-organizing center, and other organelles can be observed in the uropod, behind the nucleus. In the LE, vesicles appeared associated with filaments, which are compatible, by size, with actin filaments, in agreement with what is shown in Figure 1.

Clathrin drives actin accumulation at the LE of migrating lymphocytes

In order to test whether clathrin recruitment is necessary for further actin accumulation at the LE of migrating T cells, we knocked down clathrin and clathrin adaptors by siRNA (Fig. 3A). Clathrin or Hrs silencing did not affect the surface expression of CXCR4 (Fig. 3B), the receptor of SDF-1 α that would promote cell polarization and migration [20]. Clathrin silencing, however, resulted in a decrease of total actin polymerization in migrating cells measured by flow cytometry (Fig. 3C). Further quantification of actin accumulation at the LE was performed by image analysis of fluorescent confocal images using “FluorescenceRatio,” ad hoc home-made software, further described in Methods section, developed as a plug-in for ImageJ (NIH; Bethesda, MD); briefly, the fluorescence of F-actin at the LE was compared with the fluorescence

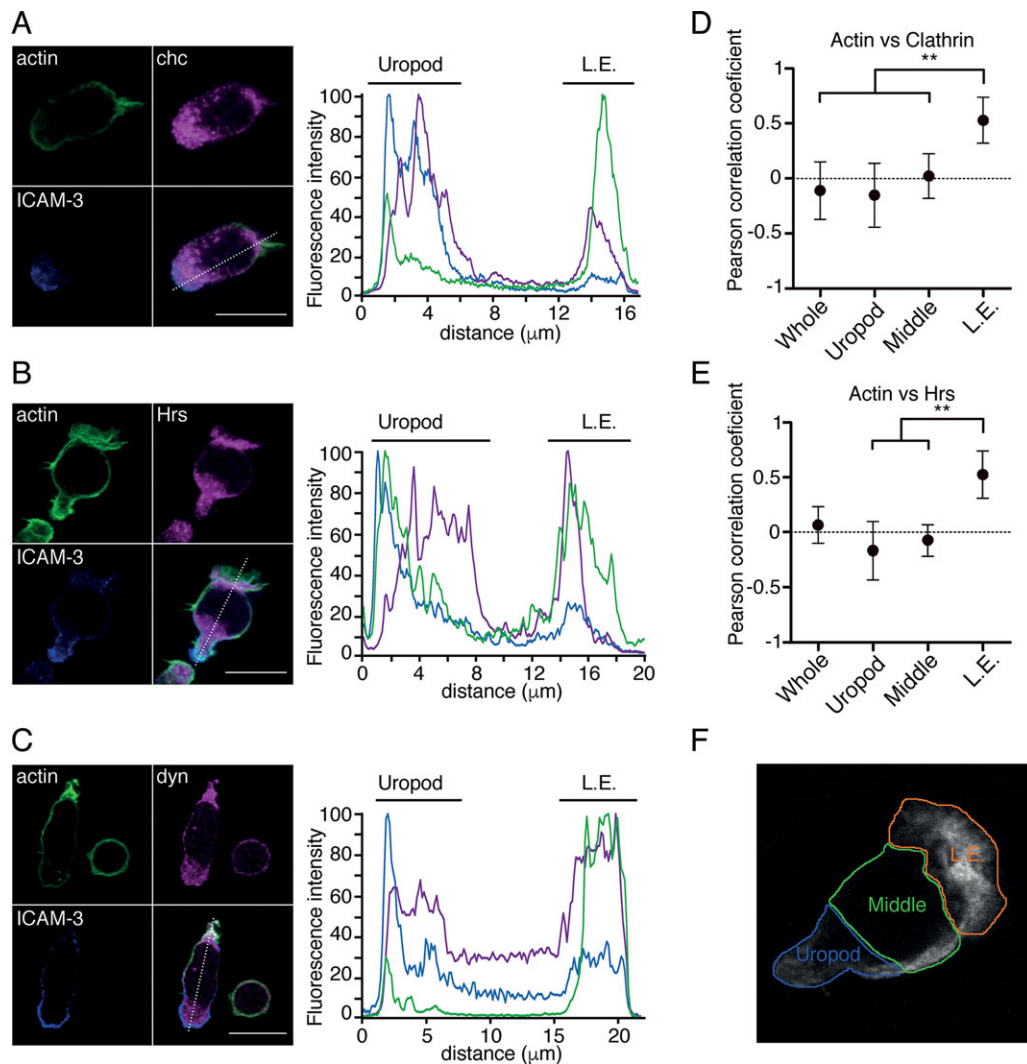


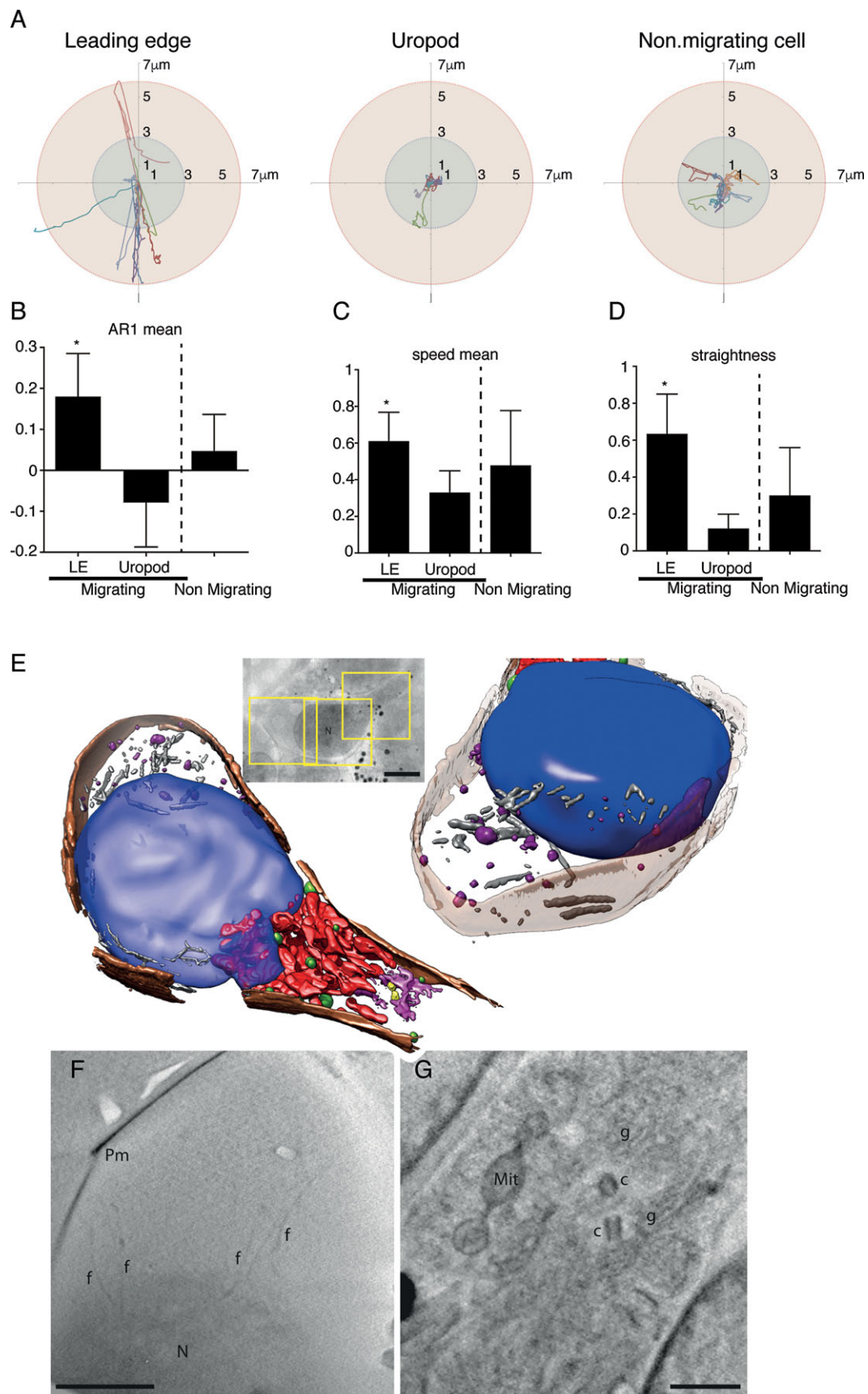
Figure 1. Clathrin and actin colocalize at the LE of migrating human cell line CEM. (A–C) Migrating CEM cells were stained for the indicated proteins (CHC; actin [detected using fluorescent phalloidin]; Hrs; and dynamin 2, dyn) and (left) imaged by confocal microscopy; uropod is marked with ICAM-3. (Right) Fluorescence intensity analysis was performed from the uropod to the LE over the line represented at the merge image. Images and graphs are representative of five independent experiments, with $n = 50$ samples each. (D and E) Colocalization analysis for actin and clathrin (D) or actin and clathrin adaptor protein Hrs (E) represented as Pearson correlation coefficient. (D and E) Data shown are pooled from four different experiments each one measuring at least 10 cells. (F). Scheme showing the different cell areas considered in the colocalization analysis.

detected in the uropod (Fig. 3D). Actin accumulation at the LE in migrating control cells was detected to be three times larger than actin accumulation in the uropod; however, clathrin-silenced cells totally lost actin accumulation at the LE (Fig. 3E). Silencing Hrs and the clathrin adaptor for the plasma membrane, AP-2, also reduced actin accumulation at the LE of migrating T cells. On the contrary, silencing AP-1, clathrin adaptor for the Golgi apparatus, had no effect in actin polymerization (Fig. 3E). These data confirm that plasma membrane clathrin and the clathrin population associated with internal vesicles are necessary not only for providing membranes at the LE [15], but also for further actin accumulation at the front of migrating lymphocytes. Accumulation of arp2 (the arp2/3 complex is the major actin-polymerizing actor, promoting actin polymerization in branched ends [21, 22]; Fig. 3F) and dynamin 2 (Fig. 3G) at cellular front were also dependent

on clathrin, Hrs and AP-2, but not on AP-1, confirming that the recruitment of actin polymerizing proteins at the LE of migrating T cells depend on the presence of clathrin. Note that in Figure 3D–G only cells with ICAM-3 accumulation at the uropod, a hallmark of cell polarization responding to the chemokine were analyzed. The amount of cells with ICAM-3 recruited at the uropod was similar in control and silenced cells (Supporting Information Fig. 1).

Clathrin play a major role in T-cell polarization in response to SDF-1 α

One major issue controlling ameboid migration is cellular polarization, which is driven at least partially, by actin



rearrangements [23]. In order to study whether clathrin, and clathrin associated to internal vesicles, plays a role in such polarization, we developed a novel image analysis software (FluoJ), also running in the ImageJ platform, that is able to automatically detect the individual cells and distinguishes their shape (Fig. 4A). This software is described in detail in the Methods section. From each individual cell, the software quantifies different predefined parameters such as the circularity, and therefore we are able to automatically analyze hundreds of individual cells, detecting polarized cells, avoiding human bias. Typical images of cell detection in control and clathrin (clathrin heavy chain [CHC]) silenced cells are shown (Fig. 4A, right panels). The frequency distribution observed between control and clathrin-silenced cells resulted different with almost 50% of control cells polarized after SDF-1 α addition, in comparison with 25% of clathrin-silenced cells (Fig. 4B). The differences resulted more drastic in the hyperpolarized population; 6% of control cells and 1% in clathrin-silenced ones (Fig. 4B). Similar results were observed in Hrs-silenced cells (Fig. 4C), which showed a reduction in the population of polarized cells compared with control cells. These data confirm the role of clathrin and more specifically of clathrin associated to MVBs in actin-dependent T-cell polarization during migration.

Clathrin play a major role in chemotaxis-induced T-cell migration

In order to test whether clathrin silencing (which resulted in reduction of actin polymerization at the LE and cellular polarization) affects the migratory capacity of T cells, we performed classical lymphocyte trans-well chemotaxis assays. Briefly, T cells were plated over the top chamber of a trans-well plate, separated by a polycarbonate-coated membrane, allowing the passage of migrating T cells, from the lower chamber filled with medium containing SDF-1 α . T cells were allowed to migrate toward the lower chamber and counted. When clathrin was silenced, we recovered 50% less cells from the bottom chamber (migrated cells) compared with control cells (Fig. 4D). Similar results were obtained when Hrs or AP-2 were silenced (Fig. 4D). On the contrary, nonsignificant results were obtained comparing control and AP-1 silenced cells. The effect of clathrin and Hrs in T-cell migration was also tested using the Jurkat cell line with similar results (Fig. 4E). In addition, we also tested whether clathrin could drive cellular migration in a 3D matrix. For that, cells were embedded in a collagen matrix and exposed to SDF-1 α gradient. 3D migration was highly com-

promised in clathrin-silenced cells compared with control ones (Fig. 4F). Similarly, Hrs reduction also affects cellular migration in 3D collagen matrix (Fig. 4F). Note that no toxic effects were detected comparing control and silenced cells.

Primary T-cell migration is also dependent on clathrin

To ascertain whether clathrin play a major role in T-cell migration in a more physiological setting, we used peripheral blood lymphocytes (PBLs) isolated from human blood. PBLs resulted more polarized in presence of SDF-1 α , and we observed more migrating cells compared to what observed using CEM cell line (data not shown).

We next tested whether silencing of clathrin or clathrin adaptors (Supporting Information Fig. 2A) impeded plasma membrane endocytosis needed for further vesicle trafficking toward the LE of migrating lymphocytes. With this purpose, the cell membranes of migrating PBLs were stained with a non permeable plasma membrane marker (CellMask Orange, Life Technologies), and after 20 min (the range of time for cell migration typically used in this study), the stain was washed away and the amount of fluorescence inside individual cells was quantified. Clathrin, or clathrin adaptors, silencing did not impede membrane uptake (Supporting Information Fig. 2B). As control, we used PBLs that were allowed to migrate longer times (1 h) after staining. They showed reduced membrane internalization when clathrin was silenced. However, Hrs silencing did not affect PBLs membrane internalization capacity (Supporting Information Fig. 2C).

The presence of endogenous clathrin, localized in both the uropod and the LE of migrating primary T cells, together with actin was assessed by fluorescence microscopy (Fig. 5A). Similar distribution pattern was also observed for Hrs and dynamin (Fig. 5B and C). Colocalization analysis shows that clathrin (Fig. 5D) and Hrs (Fig. 5E) from primary cells colocalized with actin at the LE but not in the uropod, confirming that clathrin (and clathrin associated to internal vesicles) interacts with actin at the front of migrating PBLs. Cellular migration was also impeded in clathrin- and Hrs-silenced cells (Fig. 5F), confirming again the role of clathrin in primary T-cell migration. In order to test whether the reduction in cellular migration resulted from a defect in actin accumulation, we analyzed actin accumulation at the LE by image analysis of fluorescent confocal images using the “FluorescenceRatio” software. As shown in Figure 5G, clathrin silencing reduces actin accumulation at the LE. Similarly, silencing of clathrin adaptors AP-1, AP-2,

Figure 2. Vesicle tracking in uropod and LE. (A) Human cell line CEM was transfected with td-Tomato-LCA in order to track clathrin-coated vesicles. Cell was seeded over human fibronectin-coated plates and stimulated or not with SDF-1 α and imaged in a wide-field microscope. Vesicle tracking was analyzed in the LE and the uropod in migrating cells, or whole cells in nonmigrating ones. (B–D) Autoregressive mean of order 1 (B), speed mean (C), and straightness (D) are shown. (B–D) Data are shown as mean \pm SD ($n = 30$) pooled from four independent experiments. (E) Cryo-soft X-ray tomography of a migrating T-cell. Top inset show the analyzed cell and the yellow squares represent the three adjacent tomograms acquired. Scale bar: 5 μ m. On the left and right there are volumetric representations of the cell. Blue: nucleus; brown: plasma membrane; yellow: centriole; pink: Golgi apparatus; red: mitochondria; purple: vesicles; gray: filaments, N: nucleus. (F) Slide from a reconstructed tomogram from the LE showing filaments (f). Pm: plasma membrane. Scale bar: 2 μ m. (G) Central plane of the uropod with the MTOC (“c” points to the centriole). Surrounding MTOC, “g” marks the position of the Golgi apparatus and Mit a mitochondria. Scale bar, 1 μ m. Images are representative of three independent experiments.

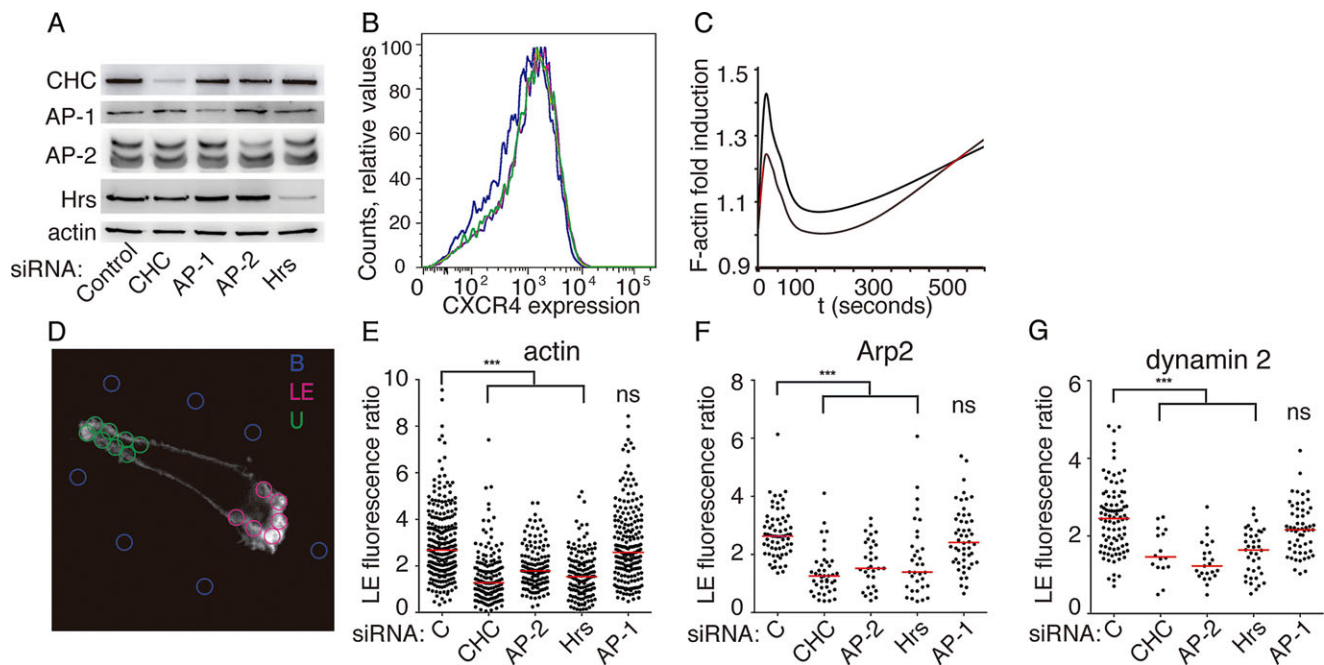


Figure 3. Clathrin and clathrin adaptor proteins are necessary for the recruitment of actin polymerizing machinery at the LE of migrating lymphocytes. (A) Protein (clathrin heavy chain and clathrin adaptors Hrs, AP-1 and AP-2) silencing by siRNA was analyzed in CEM cells by Western blotting. Blots are representative of 15 independent experiments. (B) CXCR4 (SDF-1 α receptor) expression was tested by flow cytometry. CXCR4 expression in control cells (green line), Hrs (blue) and clathrin (magenta) silenced cells are shown. Data shown are representative of three independent experiments, with $n = 10^4$ events. (C) Actin polymerization dynamics in control or clathrin-silenced CEM T cells exposed to SDF-1 α was tested by flow cytometry. F-actin content is expressed relative to time zero. One representative experiment of three is shown with control cells (black line) and clathrin heavy chain silenced cells in red. (D) To measure actin accumulation at the LE of migrating lymphocytes, we used ad hoc developed software “fluorescent ratio” comparing the fluorescence at the LE (circles in magenta) versus fluorescence in the uropod (circles in green). The fluorescence of the background was also taken into account (blue circles). (E–G) Actin (E), Arp2 (F), and dynamin 2 (G) accumulation at the LE was analyzed as shown in (D) in control cells as well as in cells silenced for the indicated proteins. Data are representative of at least three independent experiments (eight in the case of E). Significant differences ($p < 0.05$), analyzed by ANOVA followed by Dunn’s multiple comparison test, are shown by *.

and Hrs also reduced the amount of clathrin accumulated at the LE. The accumulation of dynamin 2, and Arp2/3 complex was also compromised in clathrin and clathrin adaptors silenced PBLs (Fig. 5H and I).

Discussion

All these data show compelling evidence that clathrin, similarly to what is observed in T cells during the formation of the IS [10], plays a major role in actin accumulation at the LE of migrating lymphocytes. Clathrin silencing resulted in a reduction of arp2/3 and dynamin recruitment. Arp2/3 is the main actin nucleator and dynamin 2, can cross-link numerous protein adaptors than finally would activate Arp2/3 [24]. In addition, dynamin 2 is one the known proteins that links clathrin and actin polymerization (via cortactin) [16]. We, therefore, think that clathrin-coated membranes provide a support for the recruitment of the molecular platform that initiates actin polymerization at the LE of migrating lymphocytes. By regulating actin rearrangements, clathrin also controls lymphocyte polarization and migration. Note that the first steps of polarization are not impeded in situations of clathrin reduction, that is, ICAM-3 still polarized to the uropod, which

indicates that the signal-inducing polarization, including the membrane receptors triggering this signaling, are not affected. Clathrin (or clathrin adaptors) silencing, however, dramatically reduces the hyperpolarized population, corresponding to the migratory cells.

Reducing the levels of clathrin and clathrin adaptors would indirectly affect migration by inhibiting the endocytic traffic and therefore membrane accumulation at the LE. However, the global membrane uptake at different time points was not disturbed in clathrin or in clathrin adaptors silenced cells (Supporting Information Fig. 2B). Therefore, these data obtained with the amoeboid migration of lymphocytes model confirm the intense relation of clathrin and clathrin-related proteins with the molecular machinery controlling actin rearrangements. Actin plays a major role in lymphocyte migration (and polarization) by controlling the dynamics of the cell shape during migration [25, 26]. Here, we show a model that integrate the motility signals triggered by the chemokines into coordinated actin rearrangements, being clathrin a key protein in this process that recruits the molecular machinery able to promote actin polymerization, similarly to what was observed in other biological processes [6, 10, 27].

We used different lines of human T cells as well as primary PBLs (T, B, and NK cells), indicating that this is a general mechanism

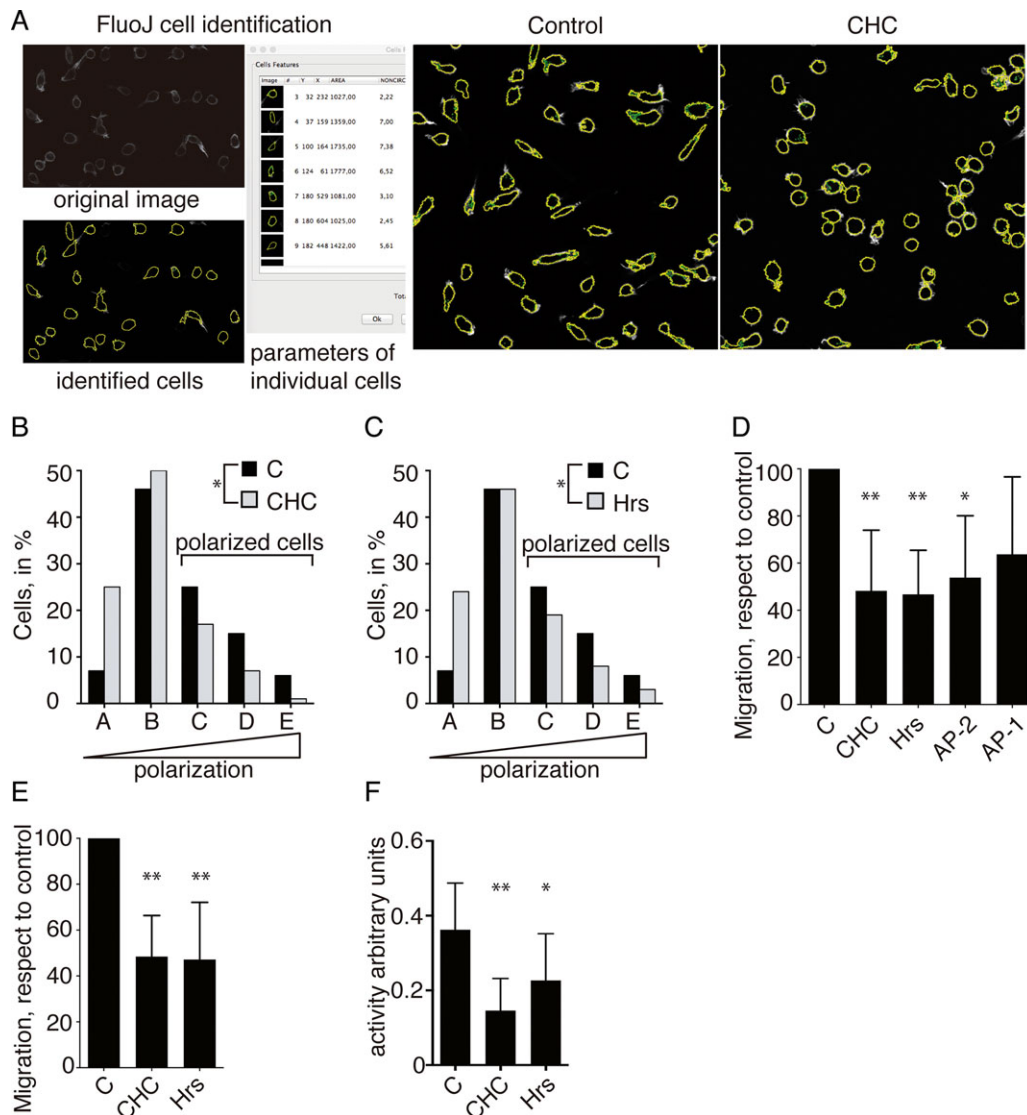


Figure 4. Clathrin deficiency affects cellular polarization and migration in 2D and 3D. (A) CEM cells were imaged by confocal microscopy and analyzed with Fluoj, a homemade software able to automatic cell identification. The software is able to identify and analyze different morphological parameters of each individual cell. An example of typical images of control and clathrin (CHC) silenced cells grown in the presence of SDF-1 α is shown. Images are representative of eight independent experiments. (B–C) Histograms representing the cell polarization analysis of the whole population of CHC (B) or Hrs (C) silenced cells compared with control -C- cells. (D) Trans-well migration assays of control or silenced for the indicated proteins CEM cells. (E) As (D) by using J77 cells. (F) 3D migration assays of CEM cells (control, CHC- and Hrs-silenced) using μ -Slide Chemotaxis 3D chambers. (B and C) Data are pooled from eight independent experiments. (D–F) Data are shown as mean \pm SD ($n = 10^4$) and are representative pooled from at least three independent experiments. Significant differences ($p < 0.05$), analyzed by ANOVA, followed by Dunn's multiple comparison test, are shown by *.

at least for cells of the lymphoid lineage. Whether this mechanism applies also to other amoeboid migrating cells, such as myeloid cells, deserve future research.

There are several differences regarding migration in primary cells compared to cell lines. Primary cells, which are more migratory, were more polarized and show a dependence on clathrin adaptor AP-1 that was not observed in cell lines. This can reflect the need for more clathrin-coated membranes, that independently of the population, that is, associated to the plasma membrane, MVB, or Golgi, can promote actin polymerization. In addition, this heterogeneity suggests that any membrane containing clathrin

could be a support for actin polymerization during lymphocyte migration.

Materials and methods

Cells lines

The acute human leukemia Jurkat J77cl20 V β 8 T and CEM cell lines were cultured in RPMI 1640 (Thermo Fisher, MA, USA)

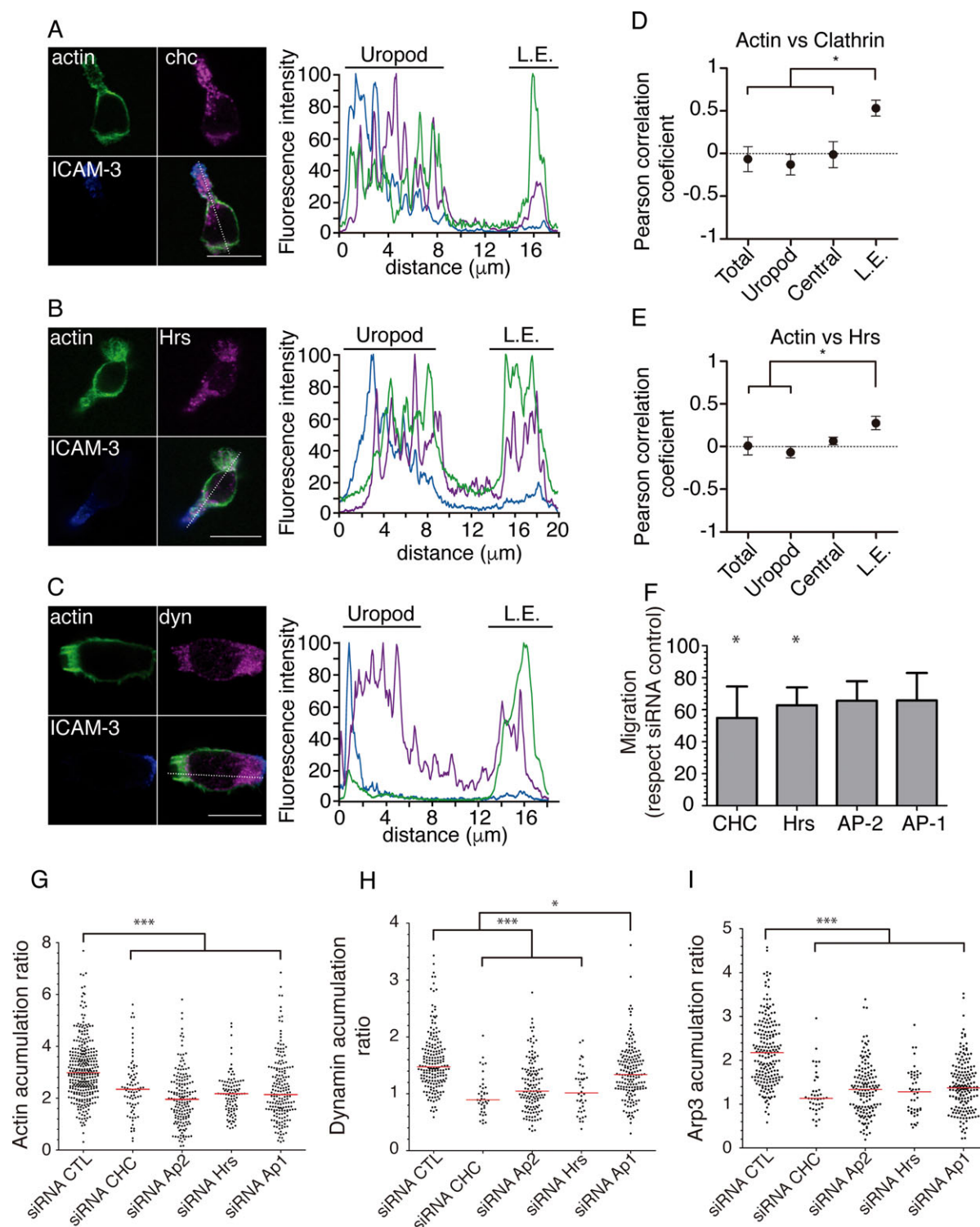


Figure 5. Clathrin localizes at the LE and drives actin accumulation in primary human lymphocytes. (A–C) Human PBLs were stained (uropod is marked with ICAM-3) for the indicated proteins and (left) imaged by confocal microscope (F-actin was detected using fluorescent phalloidin). (Right) Fluorescence intensity from uropod to LE was measured over the line represented at the merged images. Scale bar: 10 μm. Data are representative of four independent experiments. (D–E) High magnification confocal images were used for colocalization analysis of actin and clathrin (D) and actin and Hrs (E). (F) Trans-well migration assays of cells silenced for the indicated proteins. The results are represented with respect to migration in control cells (100%). Data are shown as mean ± SD. A minimum of 10e5 cells were analysed, pooled from six independent experiments. Significant differences ($p < 0.05$), analyzed by ANOVA, followed by Dunn's multiple comparison test, are shown by *. (G–I) Actin (G), Arp2 (H), and dynamin 2 (I) accumulation at the LE was analyzed in control cells as well as in cells silenced for the indicated proteins. Data are pooled from five independent experiments. Significant differences ($p < 0.05$), analyzed by ANOVA, followed by Dunn's multiple comparison test, are shown by *.

supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher) and 100 U/mL penicillin (Thermo Fisher), 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher).

Primary cells

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats (blood concentrates) obtained from healthy donors by separation on a Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) gradient according to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by a 30 min adherence step at 37°C in RPMI medium (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, UK) supplemented with 10% fetal calf serum. Human T cells were purified from PBMCs, and were stimulated with 0.5 µg/mL phytohemagglutinin (Thermo Fisher, MA, USA) during 48 h followed by extensive washing. After this step, every 2–3 days 20 U/mL human recombinant IL-2 (R&D Systems, MN, USA) was added. Studies were performed according to the principles of the Declaration of Helsinki and were approved by the local Ethics Committee for Basic Research; informed consent was obtained from all human volunteers.

siRNA electroporation

Clathrin expression was reduced by transfection of Jurkat, CEM, or PBLs cells with either a dsRNA directed against clathrin heavy chain (sense [s] 5'-GGC CCA GGU GGU AAU CAU Utt-3'; antisense [as] 5'-AAU GAU UAC CAC CUG GGC Ctg-3'; IDT, Coralville, IA, USA) or with an On-Target SMART pool against clathrin heavy chain (GE Dharmacon). AP-1 was knocked down with a single dsRNA sequence (s 5'-GUU AAG CGG UCC AAC AUU Utt-3', as 5'-AAA UGU UGG ACC GCU UAA Ctt-3'). Two sequences were used to knock down AP-2 (s 5'-GUU AAG CGG UCC AAC AUU Utt-3', as 5'-AAA UGU UGG ACC GCU UAA Ctt-3' and s 5'-CGC AGA GGG UAU CAA GUA Utt-3', as 5'-AUA CUU GAU ACC CUC UGC Gtt-3'). Hrs was knocked down either with a pair of RNA sequences (s 5'-CGA CAA GAA CCC ACA CGU Ctt-3', as 5'-GAC GUG UGG GUU CUU GUC Gtt-3' together with s 5'-AAG CGG AGG GAA AGG CCA CUUtt-3', as 5'-AAG UGG CCU UUC CCU CCG CUUtt-3'), or with an On-Target SMART pool (HGS) from (Dharmacon). Control sequences were On-Target plus nontargeting siRNA 1 and 2 (Dharmacon) or the sequence s 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG Utt-3', as 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA Att-3'. All dsRNAs were purchased from Ambion (Thermo Fisher, MA, USA), IDT, or Dharmacon. Typically 20×10^6 cells and 1 µM siRNA were mixed in 400 µL Optimem (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, UK). Electroporation were performed using a Gene Pulser II electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at time constant mode, 240 V, 32 ms, and cuvettes of 4 mm. Cells were electroporated twice with a delay of 24 h. Cells were used for experiments on day 5 and silencing was confirmed by Western blot analysis.

DNA electroporation

We used 20 µg of the corresponding(s) plasmids for each condition (20×10^6 cells), in 400 µL in cuvettes of 4 mm of Optimem. For electroporation (Gene Pulser II electroporation system [Bio-Rad]), we used the time constant mode, 240 V, 32 ms. Cells were analyzed 24 or 48 h after transfection (depending on the tagged protein expression). Twelve or 24 h after electroporation, living cells were isolated by using Biocoll Separating Solution (Biochrom) by standard procedures. Plasmids encoding for td-Tomato-LCa, GFP-actin, dynamin-GFP and LifeAct-GFP were described elsewhere [10, 28–31]. CD63-GFP (cloned in pEGFP C1) was a gift from Dr. María Yañez Mo.

Immunolabeling

Lymphocytes were plated on slides coated with poly-L-lysine or fibronectin (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 20 min at 37°C, fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) during 20 min, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Acros Organics, Thermo Fisher) in PBS (5 min) and then incubated with the indicated antibodies and revealed with Alexa-Fluor conjugated fluorescent secondary (Invitrogen, Thermo Fisher). Actin was stained with an Alexa-Fluor-conjugated phalloidin (Thermo Fisher). All samples were mounted in Prolong (Invitrogen, Thermo Fisher).

Confocal microscopy

Confocal images were obtained with a Leica TCS-SP5 confocal scanning laser unit with an inverted microscope (DMI6000B) under the control of Leica LAS AF Software. For living cell imaging, cells were plated onto fibronectin-coated (Sigma-Aldrich) 35 mm dishes (MatTek, MA, USA) and maintained at 37°C, 5% CO₂ inside an acrylic box covering the microscope. Images were analyzed using ImageJ software (NIH; Bethesda, MD, USA).

Migration assay: Trans-well

We used chambers separated by 5 µm polycarbonate filters (transwell permeable supports, Costar, NW, USA), allowing the passage of the migrating cells from the top chambers toward the bottom ones. In total, 0.5×10^6 cells were seeded in RPMI medium containing 10% FBS in the top chamber. The bottom chambers were filled with the same medium (RPMI/FBS) supplemented with 40 ng/mL SDF-1α. After 1 h at 37°C and in an atmosphere containing 5% CO₂, the top chambers were discarded and cells at the bottom medium were counted.

3D migrating assay

3D cell migration was performed using µ-Slide Chemotaxis 3D (IBIDI, Munich, Germany) following the instructions of the

manufacturer. These slides consist of two chambers (one of them filled with the chemo attractant; SDF-1 α at 40 ng/mL) connected with another chamber containing the cells, which were embedded in Matrigel (BD Biosciences, CA, USA), forming a 3D matrix. Cells recognizing the chemo attractant move toward the chamber that contains SDF-1 α . This slide was mounted in an inverted microscope (Leica TCS-SP5 confocal microscope) and images were acquired every 5 min. Images were analyzed using ImageJ (manual tracking and chemotaxis tool plugins).

Vesicle tracking

CEM cell line was transfected with td-Tomato-LCA. After 24 h transfection, cells were seeded over human fibronectin coated cover slides for 30 min. Cover slides were washed with PBS and imaged with a Leica Workstation AF 6000 LX equipped with an incubator box coupled to a CO₂ and calefactory unit (Pecan), Hamamatsu-1394ORCA-ERA-322079 camera, HCX PL APO 100 \times oil NA 1.4 objective and Leica filter N2.1. Data were processed with Imaris 6.0 software (Oxford Instruments, Oxford, UK).

Fluorescence ratio

To measure the ratio between the fluorescence of two different conditions, we follow an approach similar to the one described in [10]. We distinguish between three different regions: background alone (region A), condition 1 + background (region B), and condition 1 + condition 2 + background (region C). Let us refer to the fluorescence in each one of these regions as μ_0 (background), μ_1 (condition 1), and μ_2 (condition 2). The mean fluorescence observed in each region can be calculated as:

$$\begin{pmatrix} \mu_A \\ \mu_B \\ \mu_C \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mu_0 \\ \mu_1 \\ \mu_2 \end{pmatrix}$$

from which we can easily solve for the fluorescence of each condition

$$\begin{pmatrix} \mu_0 \\ \mu_1 \\ \mu_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mu_A \\ \mu_B \\ \mu_C \end{pmatrix}.$$

The background-corrected fluorescence ratio between regions B and C is calculated as:

$$r = \frac{\mu_1 + \mu_2}{\mu_2}.$$

FluoJ

FluoJ is a computer workbench to partially automate fluorescence image processing workflows and facilitate the analysis and quantification of a large number of cells. We used it to process our

sample with the goal of differentiating, polarized lymphocytes versus nonpolarized ones. The software has been developed in Java as an ImageJ plugin (TJ, 2007), software tool developed by the NIH and widely adopted by the scientific community. Installation (free) guide and information about the project can be found at <http://biocomp.cnb.csic.es/twiki/bin/view/FluoJ>.

In order to use FluoJ, the user goes through the following different stages: sample configuration, training (optional), and automatic image processing. We explain these stages in detail below.

1. Sample configuration. During this step, we define how to process images and register cell types. It starts with image pre-processing. This step allows us to define ImageJ commands to treat sample images before segmentation. In our case, 8-bit macro is used (to work on gray-level images this macro is always applied). Segmentation allows us to separate cells from background as well as regions of interest (ROIs) inside area for further processing. This process is illustrated in Supporting Information Figure 3A. It starts applying threshold macro, followed by Fill Holes (Supporting Information Fig. 3Ac–d). To separate superposed cells, Bright Margins is used; to detect ROIs, threshold is specified for ROIs (Supporting Information Fig. 5Ak). After segmentation, cells are registered with its corresponding points and ROIs. An example of image processing resulting from these configurations is displayed in Figure 4A.
2. Training. After sample configuration, the user can either train the classifier or directly enter into the automatic processing mode. During training, each cell is classified and stored in the database, together with its feature values (Fig. 4A and Supporting Information Fig. 3B). When several images have been processed and there are enough cells from each class, the classifier can be actually built. The classifier is a multiple-class naive Bayesian one, based on histograms of class descriptors obtained from the training data. Particle classification is performed by calculating the probability of observing the features actually measured for each possible particle type. The class maximizing the posterior probability is the one assigned to the particle. To evaluate results after training, manually classified particles are automatically classified. The confusion matrix (a matrix where each column represents the instances in a predicted class, while each row represents the instances in the actual class) and feature distributions for each class are displayed. Good features for classification must have dissimilar distributions for the different classes. The user can decide whether to keep on training or move forward to the automatic image processing step based on the results of this matrix. In our samples, we trained software until we reached 90% of accuracy (error below 10%).
3. Automatic image processing. During automatic image processing, data are registered and provided to the user (Fig. 4A) and can also be exported to plain text files. Additionally, a classification summary, with the number of particles detected for each class, and graphics with the particle features distribution are provided. We were able to process different sets of images and estimate polarization from classifier output. FluoJ provided an

easy-to-use framework to design and implement sample image processing workflow, minimizing human intervention. We were able to compare experimental and control data results, to measure features, to export data for further analysis with other software tools, etc.

F-actin determination

Levels of polymerized actin were measured as described [13]. Briefly, cells (1×10^5 per well of a 96-well plate) were incubated with 40 ng/mL SDF-1 α at 37°C for the indicated times. Cells were then fixed, permeabilized, and stained with Phalloidin-Alexa 647 (Invitrogen). Fluorescence intensity was determined in a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with Flow-Jo Software Ashland (OR, USA). Results are expressed as the fold increase in mean fluorescence intensity relative to the cells not exposed to SDF-1 α .

Western blot

Western blot was performed using standard procedures. Primary antibodies used were the following: mouse monoclonal anti-CHC (abcam; Cambridge, MA, USA), rabbit polyclonal anti-CHC (abcam), rabbit polyclonal anti-Hrs (abcam), mouse monoclonal anti Ap1 (Sigma), mouse monoclonal anti-Ap2 (AP50, BD Biosciences Pharmingen), and mouse monoclonal anti- β -Actin (Sigma). Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit were from Thermo Scientific.

Statistical analysis

Statistical analysis and comparisons were made with Graphpad Prism (Graph Pad software, La Jolla, CA, USA). Differences between means were tested by Student's *t*-test for normal data. When analyzing more than two groups, we used one-way analysis of variance (ANOVA), and multiple mean comparisons were corrected with Bonferroni posttest. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Data are shown in column bars representing the mean \pm SD of at least three independent experiments unless otherwise indicated.

Soft-X-ray tomography

CEM cells were seeded on gold quantifoil R 2/2 holey film microscopy grids (Au-G200F1) coated with poly-L-lysine and allowed to migrate for 30 min in RPMI medium containing 40 ng/mL SDF-1 α . Samples were vitrified by plunge freezing in a Leica EM CPC. Vitrified grids were transferred to Mistral (ALBA light source) [32, 33] beamline in ALBA synchrotron. For image acquisition, we used X rays with 520 eV photon energy, and X-ray projections taken at liquid nitrogen temperature with 1° tilt steps.

The zone plate objective has an outermost zone width of 40 nm; tilt series alignment reconstruction and segmentation were performed as described in [34]. We used USFC Chimera software to join the three tomograms (Supporting Information Fig. 2) reconstruction generating a whole cell final tomogram.

Membrane cell staining

PBLs cultured in RPMI + 10% FBS and antibiotics (E/P) were seeded over polylysine-covered cover slides. Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ over 20 min. After 20 min every glass is washed twice with PBS, and then PBS + cell mask (1:1000 diluted) is added in order to stain the membranes over 15 min (at 37°C + 5% CO₂). Then, glasses are washed with RPMI + FBS and antibiotics twice. After the last wash, we add RPMI + FBS + antibiotics and SDF-1 α to every glass. After the addition of the SDF-1 α medium, we fix the cells at different times with PFA at 4%. Fluorescence emission was measured by confocal microscopy. The fluorescence inside individual cells was quantified from their central focal plane. At least 80 cells per condition were analyzed in three independent experiments.

Acknowledgments: This work was supported by the grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (MICINN; BFU2011-29450 to E.V.) and Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2014-56716-REDT and BFU2014-59585-R to E.V., SAF2011-25834 to F.S.M., SAF2014-58895-JIN to A.C.A and BFU2014-54181-P to J.L.C.), the Madrid regional government (INDISNET-S2011/BMD-2332 to F.S.M.) and the European Research Council (ERC-2011-AdG 294340-GENTRIS to F.S.M.). We are grateful to the “Centro de Transfusión” of the “Comunidad Autónoma de Madrid” for providing the Buffy Coats.

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

References

- 1 Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. and Nourshargh, S., Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. 7: 678–689.
- 2 de Bruyn, P. P. H., The amoeboid movement of the mammalian leukocyte in tissue culture. *Anat. Rec.* 1946. 95: 177–191.
- 3 Lämmermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M. et al., Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 2008. 453: 51–55.
- 4 Vicente-Manzanares, M. and Sánchez-Madrid, F., Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. 4: 110–122.

- 5 Merrifield, C. J. and Kaksonen, M., Endocytic accessory factors and regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. **6**. DOI: 10.1101/cshperspect.a016733.
- 6 Veiga, E. and Cossart, P., Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 2005. **7**: 894–900.
- 7 Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A. E., Enninga, J. et al., Invasive and adherent bacterial pathogens co-opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* 2007. **2**: 340–351.
- 8 Saffarian, S., Cocucci, E. and Kirchhausen, T., Distinct Dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. In Hughson, F. (Ed.), *PLoS Biol.* 2009. **7**: e1000191. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000191.g009.
- 9 Gautier, J. J., Lomakina, M. E., Bouslama-Oueghlani, L., Derivery, E., Beilinson, H., Faigle, W., Loew, D. et al., Clathrin is required for scar/wave-mediated lamellipodium formation. *J. Cell Sci.* 2011. **124**: 3414–3427.
- 10 Calabia-Linares, C., Robles-Valero, J., la Fuente de, H., Perez-Martinez, M., Martin-Cofreces, N., Alfonso-Perez, M., Gutierrez-Vazquez, C. et al., Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *J. Cell Sci.* 2011. **124**: 820–830.
- 11 Paczkowski, J. E., Richardson, B. C. and Fromme, J. C., Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol.* 2015. **25**: 408–416.
- 12 Owen, D. J., Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem. Soc. Trans.* 2004. **32**: 1–14.
- 13 Morlino, G., Barreiro, O., Baixauli, F., Robles-Valero, J., González-Granado, J. M., Villa-Bellosta, R., Cuenca, J. et al., Miro-1 links mitochondria and microtubule Dynein motors to control lymphocyte migration and polarity. *Mol. Cell Biol.* 2014. **34**: 1412–1426.
- 14 Wojcechowskyj, J. A., Lee, J. Y., Seeholzer, S. H. and Doms, R. W., Quantitative phosphoproteomics of CXCL12 (SDF-1) signaling. In Kashanchi, F. (Ed.), *PLoS ONE* 2011. **6**: e24918. DOI: 10.1371/journal.pone.0024918.s002.
- 15 Samaniego, R., Sanchez-Martin, L., Estecha, A. and Sanchez-Mateos, P., Rho/ROCK and myosin II control the polarized distribution of endocytic clathrin structures at the uropod of moving T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 2007. **120**: 3534–3543.
- 16 McNiven, M. A., Kim, L., Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H. and Wong, T. W., Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J. Cell Biol.* 2000. **151**: 187–198.
- 17 Gomez, T. S., Hamann, M. J., McCarney, S., Savoy, D. N., Lubking, C. M., Heldebrant, M. P., Labno, C. M. et al., Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 2005. **6**: 261–270.
- 18 Schuh, M., An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat. Cell Biol.* 2011. **13**: 1431–1436.
- 19 Schneider, G., Guttman, P., Heim, S., Rehbein, S., Mueller, F., Nagashima, K., Heymann, J. B. et al., Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy. *Nat. Methods* 2010. **7**: 985–987.
- 20 Nagasawa, T., CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front. Immunol.* 2015. **6**: 1–3.
- 21 Krause, M. and Gautreau, A., Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. **15**: 577–590.
- 22 Rougerie, P., Miskolci, V. and Cox, D., Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol. Rev.* 2013. **256**: 222–239.
- 23 Niggli, V., Insights into the Mechanism for dictating polarity in migrating T-cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2014. **312**: 201–270.
- 24 Gordon-Alonso, M. and Veiga, E., Actin dynamics at the immunological synapse. *Cell Health Cytoskeleton* 2010. **2**: 33–47.
- 25 Parameswaran, N. and Gupta, N., Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration. *Immunol. Rev.* 2013. **256**: 63–79.
- 26 Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. and Rey-Barroso, J., T lymphocyte migration: an action movie starring the actin and associated actors. *Front. Immunol.* 2015. **6**: 1704–1718.
- 27 Humphries, A. C., Dodding, M. P., Barry, D. J., Collinson, L. M., Durkin, C. H. and Way, M., Clathrin potentiates vaccinia-induced actin polymerization to facilitate viral spread. *Cell Host Microbe* 2012. **12**: 346–359.
- 28 Massol, R. H., Boll, W., Griffin, A. M. and Kirchhausen, T., A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006. **103**: 10265–10270.
- 29 Boyer, L., Turchi, L., Desnues, B., Doye, A., Ponzio, G., Mege, J.-L. and Yamashita, M. et al., CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in Smurf1-/- cells. *Mol. Biol. Cell.* 2006. **17**: 2489–2497.
- 30 Cao, H., Garcia, F. and McNiven, M. A., Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 1998. **9**: 2595–2609.
- 31 Riedel, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F. et al., Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 2008. **5**: 605–607.
- 32 Pereiro, E., Nicolás, J., Ferrer, S. and Howells, M. R., A soft X-ray beamline for transmission X-ray microscopy at ALBA. *J. Synchrotron Radiat.* 2009. **16**: 505–512.
- 33 Sorrentino, A., Nicolás, J., Valcárcel, R., Chichón, F. J., Rosanes, M., Avila, J., Tkachuk, A., Irwin, J., Ferrer, S., Pereiro, E., MISTRAL: a transmission soft X-ray microscopy beamline for cryo nano-tomography of biological samples and magnetic domains imaging. *J. Synchrotron Radiat.* 2015. **22**: 1112–1117.
- 34 Cruz-Adalia, A., Ramirez-Santiago, G., Calabia-Linares, C., Torres-Torresano, M., Feo, L., Galán-Díez, M., Fernández-Ruiz, E. et al., T cells kill bacteria captured by transinfection from dendritic cells and confer protection in mice. *Cell Host Microbe* 2014. **15**: 611–622. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312814001401>.

Abbreviations: IS: immunological synapse · LE: leading edge · MVB: multivesicular body · ROI: region of interest · SDF-1 α : stromal cell derived factor 1 α

Full correspondence: Dr. Esteban Veiga, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Instituto de Investigación, Sanitaria Hospital de la Princesa, Hospital de Santa Cristina, Darwin 3, E-28049 Madrid, Spain
Fax: +34 915202374
e-mail: eveiga@cnb.csic.es

Received: 7/1/2016
Revised: 7/6/2016
Accepted: 6/7/2016
Accepted article online: 13/7/2016

Video Article

T Cells Capture Bacteria by Transinfection from Dendritic Cells

Aranzazu Cruz-Adalia¹, Guillermo Ramírez-Santiago^{1,2}, Mónica Torres-Torresano^{1,2}, Raquel García-Ferreras^{1,2}, Esteban Veiga Chacón¹

¹Cellular and Molecular Biology, Spanish National Research Council (CSIC), Spanish National Biotechnology Centre (CNB-CSIC)

²Hospital de Santa Cristina, Healthcare Research Institute Princesa Hospital (IIS-Princesa)

Correspondence to: Aranzazu Cruz-Adalia at acruz@cnb.csic.es, Esteban Veiga Chacón at eveiga@cnb.csic.es

URL: <http://www.jove.com/video/52976>

DOI: [doi:10.3791/52976](https://doi.org/10.3791/52976)

Keywords: Immunology, Issue 107, transinfection, antigen presentation, T cells, dendritic cells, bacteria, gentamicin survival assay

Date Published: 1/13/2016

Citation: Cruz-Adalia, A., Ramírez-Santiago, G., Torres-Torresano, M., García-Ferreras, R., Veiga Chacón, E. T Cells Capture Bacteria by Transinfection from Dendritic Cells. *J. Vis. Exp.* (107), e52976, doi:10.3791/52976 (2016).

Abstract

Recently, we have shown, contrary to what is described, that CD4⁺ T cells, the paradigm of adaptive immune cells, capture bacteria from infected dendritic cells (DCs) by a process called transinfection. Here, we describe the analysis of the transinfection process, which occurs during the course of antigen presentation. This process was unveiled by using CD4⁺ T cells from transgenic OTII mice, which bear a T cell receptor (TCR) specific for a peptide of ovalbumin (OVAp), which therefore can form stable immune complexes with infected dendritic cells loaded with this specific OVAp. The dynamics of green fluorescent protein (GFP)-expressing bacteria during DC-T cell transmission can be monitored by live-cell imaging and the quantification of bacterial transinfection can be performed by flow cytometry. In addition, transinfection can be quantified by a more sensitive method based in the use of gentamicin, a non-permeable aminoglycoside antibiotic killing extracellular bacteria but not intracellular ones. This classical method has been used previously in microbiology to study the efficiency of bacterial infections. We hereby explain the protocol of the complete process, from the isolation of the primary cells to the quantification of transinfection.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/52976/>

Introduction

When a pathogen infects its host, there is usually an activation of the innate and adaptive immune responses, necessary for bacterial clearance. Innate immunity is the first line of defense that prevents most infections. Innate immunity distinguish in a precise way elements that are conserved among broad groups of microorganisms (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)¹. The mechanisms of innate immunity include physical barriers such as skin, chemicals barriers (antimicrobial peptides, lysozyme) and the innate leukocytes, which include the phagocytes (macrophages, neutrophils, and dendritic cells), mast cells, eosinophils, basophils, and natural killer cells². These cells identify and eliminate pathogens, either by attacking them through contact or via phagocytosis, which includes pathogen engulfing and killing. This system does not allow lifelong defense, in contrast to adaptive immunity, which confer immunological memory against pathogens. The adaptive immune system is the second line of defense and is able to recognize and react to specific antigens of multiple microbial and non-microbial substances³. The main components of the adaptive immune system are the lymphocytes, which include B and T cells. B cells are involved in the humoral response, secreting antibodies against pathogens or exogenous proteins. However, T cells represent the cell-mediated immunity, modulating the immune response with cytokines secretion or killing pathogen-infected cells⁴.

Antigen presenting cells (APCs) including dendritic cells or macrophages, constituents of the innate immune system, can recognize phagocytose pathogens and process bacterial components into antigens, which are presented at the cell surface by the Major Histocompatibility Complex (MHC)⁵⁻⁷. After APCs have phagocytized pathogens, they usually migrate to the draining lymph nodes, where they interact with T cells. T lymphocytes can recognize specific peptide-MHC complexes by their T cell receptors. The immune synapse (IS) occurs in the interface between an antigen-loaded APC and a lymphocyte during antigen presentation^{8,9}. Some bacteria can survive phagocytosis and disseminate systematically within APCs. In this view, infected APCs serve as bacterial reservoirs or "Trojan horses" that facilitate bacterial spread¹⁰. The intimate contact between APCs and lymphocytes that take place during the course of IS formation also function as a platform for exchange of part of membranes, genetic material and exosomes and can be hijacked for some viruses to infect T cells; this process is called transinfection¹¹⁻¹³.

Some pathogenic bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri*) are able to invade T lymphocytes *in vivo* and modify their behaviour¹⁴⁻¹⁶. We have recently described that T lymphocytes are also able to capture bacteria by transinfection from previously infected dendritic cells (DCs) during the course of antigen presentation¹⁶. T cell bacterial capture by transinfection exceedingly more effective (1,000-4,000x) than direct infections. T cells capture pathogen and non-pathogen bacteria indicating that transinfection is a process driven by T cells. Strikingly, transinfected T (tiT) cells rapidly killed the captured bacteria and did so more efficiently than professional phagocytes¹⁶. These results, which break a dogma of immunology, show that the cells of adaptive immunity can perform functions that were supposedly exclusive of the innate immunity. In addition, we showed that tiT cells secrete large amounts of pro-inflammatory cytokines and protect from bacterial infections *in vivo*.

Here we present the different protocols used to study the bacterial transinfection process in a mouse model. This model is based on the use of CD4⁺ T cells from transgenic OTII mice, which bear a TCR specific for peptide 323-339 of OVA (OVAp) in the context of I-Ab¹⁷ that interact specifically with bacterial-infected bone marrow-derived DCs (BMDCs)^{18,19} loaded with OVAp, forming stable immune synapses.

T cell transinfection can be visualized and tracked using fluorescence microscopy. Additionally, flow cytometry can be used for detecting infected cells by taking advantage of the fluorescence emitted by bacteria expressing green fluorescent protein (GFP)^{16,20}. Moreover, T cell transinfection can be quantified by a more sensitive approach, the gentamicin survival assay that allows measurement of a large number of events. Gentamicin is an antibiotic that cannot penetrate eukaryotic cells. Therefore, using this antibiotic allows differentiation of intracellular bacteria that survived the antibiotic addition from extracellular ones that were killed²¹.

Protocol

Note: Experimental procedures were approved by the Committee for Research Ethics of the Universidad Autónoma de Madrid and conducted under the supervision of the Universidad Autónoma de Madrid Head of Animal Welfare and Health in accordance with Spanish and European guidelines. Mice were bred in specific pathogen free (SPF) housing and they were euthanized by trained and qualified personnel using carbon dioxide (CO₂) inhalation method.

1. Mouse Bone Marrow-derived DCs Differentiation and Infection

Note: **Figure 1** summarizes this first step. All procedures should be carried out in the hood from this point on, using only sterile media, instruments, pipette tips and culture dishes.

1. Mouse Bone Marrow-derived DCs Differentiation

1. Dissect tibias and femurs from one C57/BL6 mouse²² and transfer into a plastic dish with 10 ml of RPMI medium.
2. Cut each epiphysis off, with sterile scissors and expose bone marrow, which has a characteristic bright red color.
3. Infuse the inside of the bone with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (PBS/BSA/EDTA buffer) using a sterile syringe on a sterile Petri dish.
4. Collect the cell suspension and centrifuge in a tube at 600 x g in a refrigerated centrifuge (4 °C).
5. Resuspend the cells in 1 ml of Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) lysing buffer (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ and 0.1 mM EDTA) and incubate for 30 sec at RT in order to eliminate red blood cells.
6. Add 10 ml of RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS) and filter through a cell strainer (70 µm) to remove bone fragments and cell clumps before centrifuging at the same speed (600 xg) because clumps were eliminated by filtering.
7. Count the cells and adjust to 5 x 10⁵ cells/ml with RPMI 10% FBS (containing 50 µM B-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate) and add 20 ng/ml recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rm-GM-CSF) as a final concentration.
8. Add this suspension to a sterile, microbiological quality, 15 cm Petri dish, and culture in a CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂).
9. Every three days, spin down both non-adherent cells and detached cells with 5 mM EDTA in PBS and resuspend at 5 x 10⁵ cells/ml of cell density, with fresh medium containing 20 ng/ml rm-GM-CSF.

2. Maturation of DCs and Antigen Loading

1. At day 9, resuspend the cells at 5 x 10⁵ cells/ml of density in medium containing 20 ng/ml rm-GM-CSF. Then add 20 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS) to allow high MHC-II expression on cells and incubate in a non-tissue culture-treated sterile 15 cm Petri dish for 24 hr.
2. After one day of LPS-stimulation, stain some DC cells with antibodies against mouse CD11c, MHCII and Gr-1 to check DCs differentiation by flow cytometry. An example of flow cytometry analysis of DCs is shown in **Figure 3A** and **3B**.
 1. Incubate DCs (5 x 10⁵ cells/sample) with an anti-mouse-CD16/CD32 monoclonal antibody at 2.5 µg/ml of final concentration in 50 µl PBS/BSA/EDTA buffer per sample. Afterwards, add 50 µl of the antibodies against MHCII (I-A/I-E), CD11c and Gr-1 conjugated with different fluorochromes at 1:100, 1:200 and 1:500 in PBS/BSA/EDTA buffer respectively.
 2. Finally, wash DCs with PBS/BSA/EDTA buffer and analyze by flow cytometry according to manufacturer's protocol.
Note: If the cells are well differentiated, cells are ready for antigen loading.
3. Wash DCs with RPMI 10% FBS (without antibiotics) and incubate them with 10 µg/ml OTII OVAp (OVA 323-339; I S Q A V H A H A E I N E A G R) on a plastic tube in 1 ml of RPMI 10% FBS medium per 5 x 10⁶ DCs for minimum 1 hr at 37 °C. As a negative control, leave DCs without incubating with OVAp.

3. Infection of DCs

1. Infect DCs at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria (10 bacteria per DC) for 1 hr in a CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂).
2. Wash DC cells 3x in PBS and 1x in RPMI 10% FBS and centrifuge at 450 x g in order to wash most of extracellular bacteria. Finally, resuspend cells in RPMI 10% FBS medium (without antibiotics) at 20 x 10⁶ cells/ml.

2. Isolation of CD4⁺ T Lymphocytes from OTII Transgenic Mice

Note: **Figure 1** summarizes this second step. Lymph nodes should be used instead of spleen to isolate CD4⁺ T cells, because the proportion of CD4⁺ lymphocytes in lymph nodes (~50%) is larger than in spleen (~25%) and therefore the purification would be more effective.

1. Make Single-cell Suspension of Lymph Nodes

1. Remove inguinal, axillary, brachial, cervical and mesenteric lymph nodes²³ from OTII transgenic mice and transfer into a plastic dish with 10 ml of RPMI 10% FBS medium.

2. Grind lymph nodes under a sterile hood using two frosted microscope slides. Place lymph nodes on a frosted side of one microscope slide, and rub with frosted side of the second slide until organs have been ground.
 3. Wash single cell suspension in PBS/BSA/EDTA buffer.
 4. Filter the cells through a cell strainer (70 μ m) to remove connective tissue and wash with PBS/BSA/EDTA buffer.
 5. Resuspend the cells in 1 ml of ACK lysis buffer and incubate for 1 min at RT in order to eliminate red blood cells.
2. Isolation of CD4⁺ T Cells
1. Wash again as in step 2.1.3 and count cells to resuspend them at 100×10^6 cells/ml in PBS/BSA/EDTA buffer. Add biotinylated antibodies against CD8, IgM, B220, CD19, MHC class II (I-Ab), CD11b, CD11c and DX5 at 1:250 for 30 min on ice for later negative selection of CD4⁺ T cells.
 2. Wash cells in PBS/BSA/EDTA buffer and incubate the cells (100×10^6 cells/ml) with streptavidin microbeads at the concentration recommended in manufacturer's protocol for 15 min on ice.
 3. Wash cells in PBS/BSA/EDTA buffer and filter them through a cell strainer (30 μ m) before CD4⁺ T cell isolation.
 4. Isolate CD4⁺ T cells by negative selection using a magnetic cell separation machine according to manufacturer's protocol.
 5. Count the cells and adjust to 4×10^6 cells/ml with RPMI 10% FBS medium (without antibiotics).
 6. Fix and keep on ice isolated CD4⁺ T cells (3×10^5 cells) to check the purity by flow cytometer as described²⁴. An example of CD4⁺ T cells purification is shown in **Figure 3C**.

3. T Cell Transinfection Measurement by Gentamicin Protection Assay

Note: **Figure 2** summarizes this third step of the protocol.

1. T cell Transinfection
 1. Incubate isolated CD4⁺ T cells with infected DC cells (1:1) (the DCs were infected for 1 hr and washed to eliminate free bacteria) for 30 min to allow immune synapse formation in a CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂).
 2. Add 0.5 ml of isolated CD4⁺ T cells (2×10^6 cells) and 0.1 ml of infected DCs (2×10^6 cells) on a 24-well culture plate. As negative control, infect directly 0.5 ml of CD4⁺ T cells at a MOI of 10 bacteria for 30 min.
 3. Include additional controls separating infected DCs from T cells using a polycarbonate transwell barrier (with 3 μ m of pore size), impeding DC-T physical contact. Add 0.1 ml of DCs inside the transwell and 0.5 ml of CD4⁺ T cells into the lower compartment of the well (24-well plate).
 4. Finally, complete with RPMI medium until there is 0.6 ml in each well to make equal volumes in all samples.
 5. After 30 min of immune synapse formation, add 100 μ g/ml of gentamicin and incubate for 1 hr before collecting cells in a CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂).
2. Re-isolation of CD4⁺ T Cells
 1. Collect non-adherent cells and resuspend them in PBS/BSA/EDTA buffer. Most of DCs remain attached to the plastic culture plate. Vortex tubes gently to ensure cell disaggregation. Keep 500 μ l of cell supernatant as control to show that gentamicin has worked well.
 2. Re-isolate CD4⁺ T cells from samples that contain DCs and T cells together as in step 2.2, although most of the DCs should have attached on the plate. Keep the control samples on ice. Take into account only experiments with less than 2% contamination. An example of CD4⁺ T cells purification after transinfection is shown in **Figure 3D**.
3. Lyse T Cells and Seed Them on Bacteria Medium-agar Plates.
 1. Wash CD4⁺ T cells twice with PBS.
 2. Count the cells and resuspend them at 2×10^6 cells/ml in PBS.
 3. Add 500 μ l of 0.1% Triton X-100 in 500 μ l of T cells to lyse them at 1×10^6 cells/ml, releasing the intracellular bacteria out of the T cells.
 4. Make 3 serial decimal dilutions of lysed cells and seed 50 μ l of each dilution on bacteria medium agar plates. Divide plates into 4 portions and seed the different dilutions of lysed cells in each part. Representative results are shown in **Figure 4**.
 1. As a control, also plate the stored cell supernatant of the conjugates on agar, to ensure that gentamicin has worked well. Also plate infected DCs as an additional control. In case low DCs contamination occurs (<2%), subtract the colony forming units (CFUs) corresponding to low DC contamination.

4. Quantification of T Cell Transinfection by Flow Cytometry

Note: **Figure 2** summarizes this step.

1. T Cell Transinfection
 1. Infect BMDCs as in step 1.3, but use GFP expressing bacteria in this case.
 2. Stain CD4⁺ T cells (isolated from lymph nodes in step 2.2) with a cell tracker chloromethyl aminocoumarin (CMAC) for 30 min at 37 °C according to manufacturer's protocol.
 3. Wash labelled CD4⁺ T cells twice with RPMI 10% FBS (without antibiotics).
 4. Incubate infected DCs (after 1 hr incubation with bacteria) with labelled CD4⁺ T cells for 30 min to allow immune synapse formation at 37 °C including all the controls explaining in step 3.1.1.
2. Staining of Infected CD4⁺ T Cells
 1. After 30 min of DC-T immune synapse formation, collect cells and wash them in PBS/BSA/EDTA.
 2. After two washes with PBS/BSA/EDTA buffer, separate aggregated cells by gently vortexing the tubes.
 3. Fix the samples in 0.2 ml/tube of PBS containing 3% PFA for 15 min at RT. Then wash them in PBS.

4. Incubate with anti-mouse-CD16/CD32 monoclonal antibody (2.5 µg/ml) in 50 µl/sample of PBS/BSA/EDTA for 15 min on ice to block Fc receptors of dendritic cells.
5. Add a rabbit anti-bacteria antibody (10 µg/ml as final concentration) in 50 µl/sample of PBS/BSA/EDTA for 30 min on ice to stain extracellular bacteria.
6. Wash cells with PBS/BSA/EDTA and incubate with an antibody against mouse CD11c conjugated with phycoerythrin (PE) and a secondary antibody against rabbit conjugated with other fluorochrome like Alexa-Fluor 647 at 1:200 in 100 µl/sample of PBS/BSA/EDTA for 30 min on ice.
7. Wash cells and analyze samples by flow cytometry. Do not forget to include a sample of transinfected T cells using non-fluorescent bacteria as negative control and samples labelled with just one of each fluorochrome used in the experiment to compensate the samples and adjust the flow cytometry settings²⁵. Representative analysis is shown in **Figure 5**.
Note: If bacteria do not express GFP, to distinguish intracellular and extracellular bacteria, label extracellular bacteria, fix, and permeabilize samples with Triton X-100 at 0.5% in PBS for 5 min. Afterwards stain total bacteria (intracellular + extracellular) with a different fluorochrome.

Representative Results

Herein we described how to perform murine T cell bacterial transinfection from infected bone marrow derived-DCs and how to measure bacterial transinfection via two different approaches: flow cytometry and gentamicin survival assay. **Figure 1** summarizes the procedure to obtain the cells. DCs are generated by incubation of bone marrow cells with GM-CSF for 9 days. Then, DCs are matured with LPS to increase MHCII on its membrane to load them later on with a specific peptide of OVA (OVAp). As a control, some DCs are not loaded with OVAp. Both DCs (OVAp-loaded and non-loaded) are infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria. On the other hand, CD4⁺ T cells are isolated from lymph nodes of OTII transgenic mice, which recognize the specific OVAp. **Figure 2** depicts the procedure to perform and quantify T cell transinfection including the appropriate negative controls. As described before, some DCs are not loaded with OVAp. In this case, there is an interaction between DCs and T cells, but not immune synapse formation due to the absence of OVAp. An additional control is included, separating DCs and T cells with a polycarbonate transwell barrier (with 3 µm of pore size), which impedes DC-T physical contact. DCs are included inside the transwell; as a result they are not able to pass through this pore size. Another negative control is also incorporated, the direct T cell infection, by incubating T cells directly at a MOI of 10 bacteria. T cell transinfection can be quantified by two approaches: flow cytometry or gentamicin survival assay. To measure by flow cytometry, DCs should have been infected previously with bacteria-GFP and CD4⁺ T cells stain with a cell tracker (T cells-blue). After conjugate formation, the cells should be stained with antibodies against DCs (CD11c-PE). The extracellular bacteria should also be stained in order to quantify the percentage of infected CD4⁺ T cells by flow cytometry later on. To measure transinfection by gentamicin survival assay, cells are incubated with gentamicin for 1 hr to kill extracellular bacteria, then T cells are re-isolated to seed on agar plate. Decimal serial dilutions are made to seed 50 µl of each dilution on agar plate and facilitate the counting of CFUs.

As shown in **Figure 3**, DC differentiation has to be checked by flow cytometry (**Figure 3A** and **3B**). DCs should express CD11c and MHCII (**Figure 3A**) and not Gr-1, which is a marker of neutrophils. As presented in **Figure 3B**, some neutrophils (3.27% of Gr-1⁺, MHC⁺) were presented in the culture, but DCs culture with more than 5% of neutrophils contamination should not be used. CD4⁺ T cells purity should be checked after isolation from lymph nodes (**Figure 3C**) and after separation from DCs conjugates formation (**Figure 3D**). Take into account the experiments with less than 2% of contaminants after conjugates formation.

Figure 4 shows an example of T transinfection experiment using *Salmonella*. As illustrated in **Figure 4A**, plates are divided in four portions to seed the serial dilutions in each part. *Salmonella* have grown on LB agar plates and colony-forming units can be counted. As shown in **Figure 4A**, *Salmonella* was captured by T cells from infected DCs and this process was clearly enhanced with OVAp recognition (plates on the left of **Figure 4A** and **Figure 4B**). However, when there was a physical barrier impeding the contact between DCs and T cells, there was virtually no transinfection, as in the case of doing a direct T cell infection (plates on the right of **Figure 4A** and **Figure 4B**).

As shown in **Figure 5**, T cell transinfection can be quantified by flow cytometry using bacteria expressing a bright GFP. DCs and T cells can be differentiated by size and complexity in a forward and side scatter plot, but different markers can be used to well distinguish them. CD4⁺ T cells were labelled with a cell tracker (CMAC) and DCs with an antibody against CD11c. Extracellular bacteria were stained with a rabbit antibody against *Salmonella* and secondary antibody anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor 647. Therefore, the percentage of infected CD4⁺ T cells can be quantified because they are labelled with CMAC (not with CD11c-PE) and expressed GFP (bacteria-GFP), but they were not stained with the antibody against extracellular bacteria (Alexa Fluor 647).

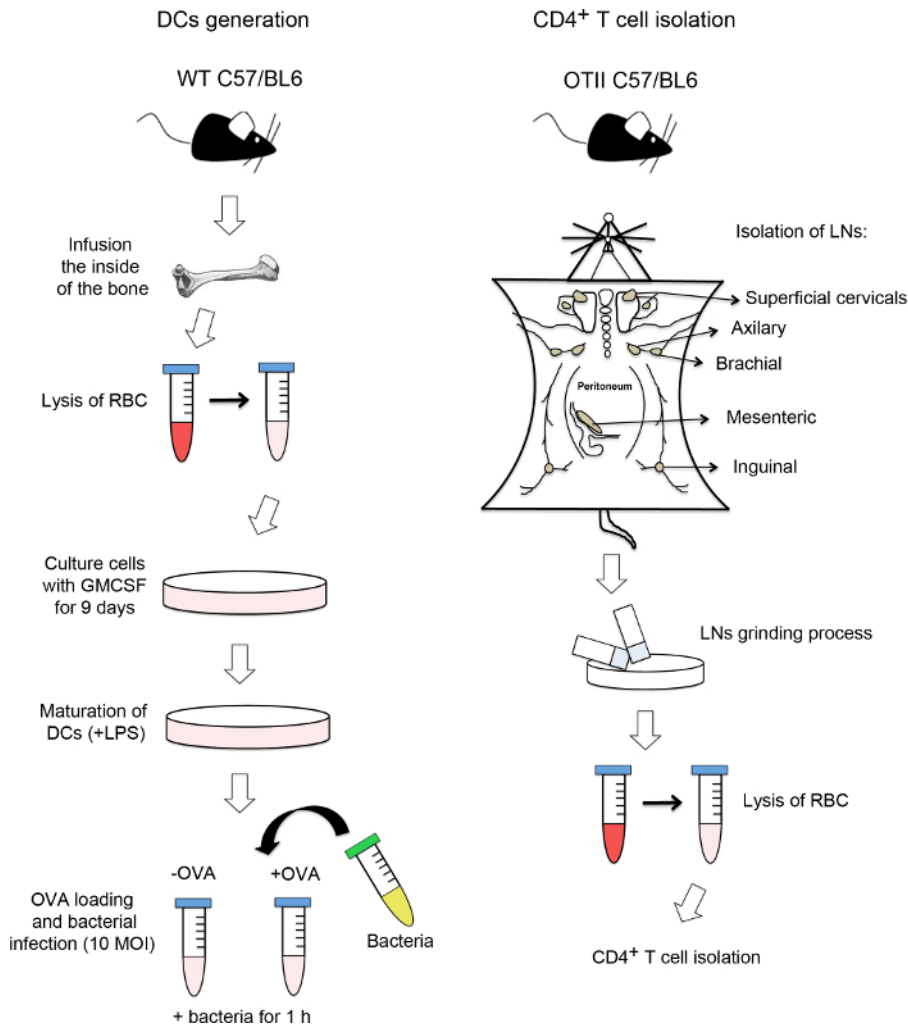


Figure 1. Flow chart of DC generation and CD4⁺ T cells isolation. On the left hand side of the figure, the process to differentiate dendritic cells (DCs) from bone marrow cells is detailed. After dissecting femurs and tibias, bone marrow cells are extracted from the interior of the bones. Afterwards, red blood cells (RBC) are lysed and bone marrow cells are cultured with recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for 9 days. Once they are well differentiated, DCs are incubated with lipopolysaccharide (LPS) to increase Major Histocompatibility Complex II (MHCII) expression. Then, DCs are loaded with a specific ovalbumin peptide (OVA) and infected with a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria. Some of them are not loaded with OVA as a control. On the right hand side of the figure, how to isolate CD4⁺ T cells from OTII transgenic mice is represented. Lymph nodes (LNs) are removed and ground, obtaining a single-cell suspension. Finally, CD4⁺ T cells are isolated by negative selection using a magnetic cell separation machine. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

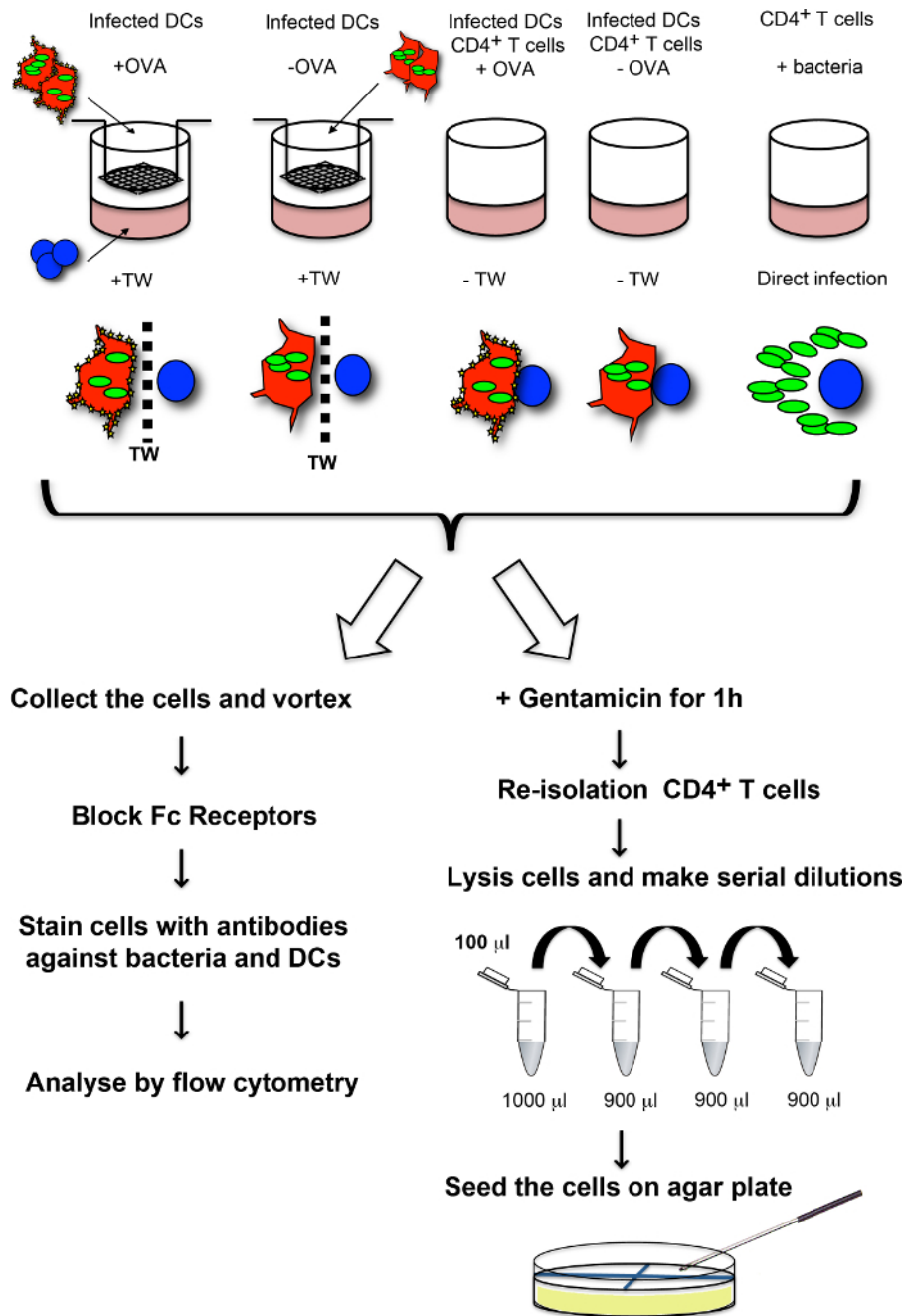


Figure 2. Flow chart of T cell transinfection procedure. Infected (bacteria are depicted in green) and OVAp loaded-DCs (red cells) are incubated with CD4⁺ T cells (blue cells) to allow immune synapse formation. Infected DCs (but not loaded with OVAp) are also incubated with T cells, which allows interaction between both cells but without immune synapse formation. An additional control is included, separating CD4⁺ T cells and DCs with a polycarbonate transwell barrier (+TW), which impedes DC-T cell contact. Direct T cell infection is also incorporated as negative control. Finally, T cell transinfection can be quantified by two methods, by flow cytometry (left side of the figure), which indicates the number of T cells capturing bacteria, and by gentamicin survival assay (right side of the figure) a very sensitive method (one infecting bacterium can be detected) indicating the bacterial infection rate. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

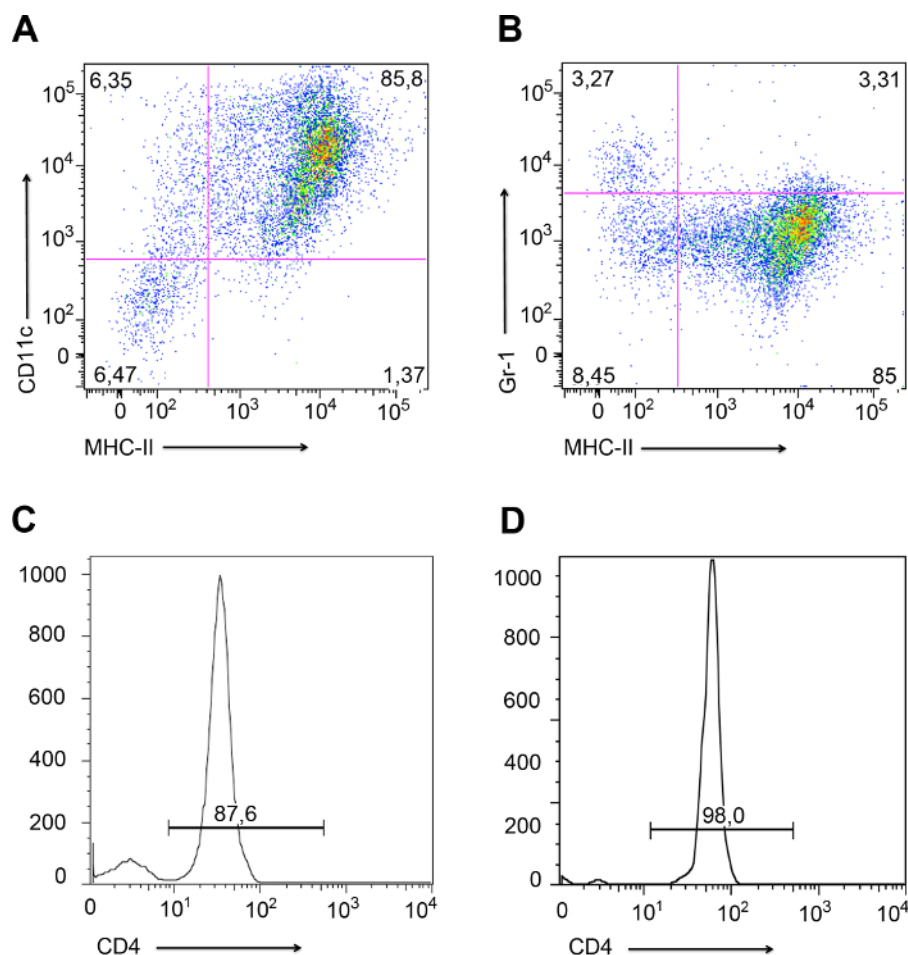


Figure 3. Flow cytometer analysis of bone marrow derived-DCs and isolated CD4⁺ T cells. Representative dot plots of bone marrow derived-DCs analysed by flow cytometry. (A) DCs expressed MHCII and CD11c (85.8%; upper right quadrant) (B) DCs expressed MHCII but not Gr-1 (85%; lower right quadrant). However, there was a 3.27% of cells that expressed Gr-1 but not MHCII cells (upper left quadrant). These cells were slight contaminated neutrophils. (C and D) Histograms representing the purity of CD4⁺ T cells isolated from lymph nodes (C), and after conjugate formation with dendritic cells (D). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

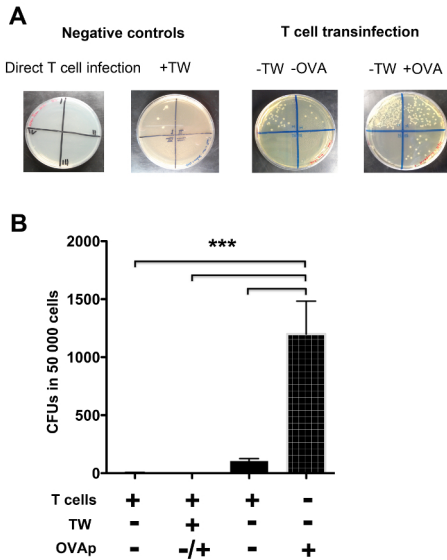


Figure 4. T cell transfection quantified by gentamicin survival assay. LB agar plates were divided into 4 portions corresponding to decimal serial dilutions of lysed CD4⁺ T cells. **(A)** Colony forming units of *Salmonella enterica* grew on LB agar plates corresponding to T cell transfection in the presence (+) or absence (-) of OVAp on the surface of infected DC, and in conditions allowing DC/T cell contact (-TW) or in the presence of a physical barrier impeding such contacts (+TW). An empty plate corresponding to direct T cell infection (negative control) is also shown. There was almost no transfection when DC/T cell contact was impeded (+TW). **(B)** Quantification of Colony Forming Units (CFUs) from several experiments showing the rate of bacterial captured by T cells from infected DCs. Direct T cell infection, and conditions impeding DC/T cell contact produce little to no levels of T cell infection. When DC/T cell contacts were permitted, there was T cell transfection, and it was enhanced by antigen recognition (+OVAp). Column bars represent the mean of 3 independent experiments. Error bars indicate the SD. Significant differences are represented by ***, corresponding to $p < 0.0001$. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

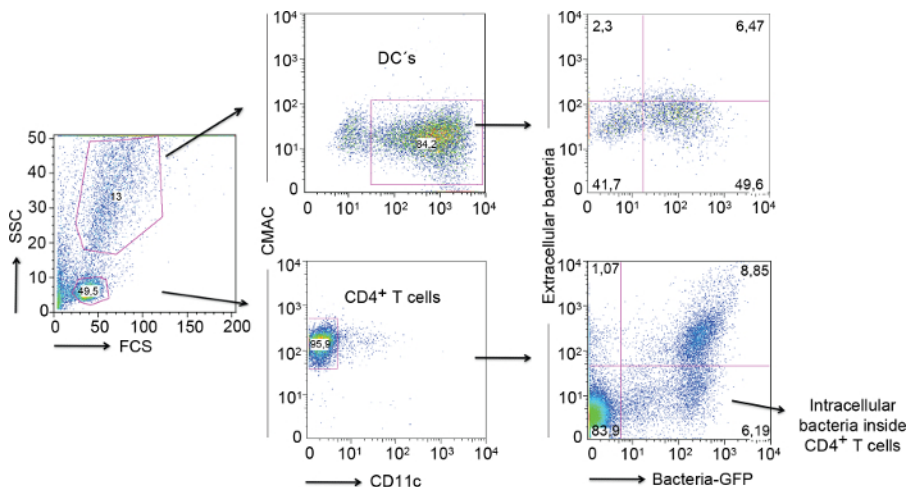


Figure 5. T cell transfection quantified by flow cytometry. Representative dot plot showing DCs and T cell conjugates after transfection process. CD4⁺ T cells are small and round as forward and side scatter (FCS - SSC) dot blot shows, and in order to be well differentiated, they were stained with a cell tracker (CMAC). DCs expressing CD11c are not labelled with CMAC and are larger than T CD4⁺ T cells with irregular shape. Infected CD4⁺ T cells containing intracellular bacteria-GFP but negative for extracellular bacteria (6.19%) are shown in the lower right quadrant. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

T cells or T lymphocytes are a type of leukocytes that play a central role in cell-mediated immunity and belong to the adaptive immune response²⁶. T cells are refractory to being infected *in vitro* but some reports indicate that they can be infected *in vivo*^{14,15}. The intimate contacts of APC and T cells during immune synapse serve as platforms for exchanging biological material¹³, including some viruses such as HIV¹¹. It was recently shown that contrary to the dogma, T cells, the paradigm of cells of adaptive immunity, are also able to efficiently capture bacteria by transfection from infected DCs^{11,16}. Herein we show the detailed protocols to quantify T cell bacterial transfection *in vitro* from infected BMDCs.

T cell bacterial transfection was enhanced by antigen recognition¹⁶. We showed that by using CD4⁺ T cells isolated from OTII transgenic mice recognizing a specific OVAp, BMDCs loaded with OVAp and mice infected with different bacteria (here data is presented from *Salmonella enterica*). CD4⁺ T cell isolated from OTII mice are incubated with infected DCs for 30 min to allow immune synapse formation. The data

presented here correspond to the bacteria that T cells can capture from DCs in this short period of time. We know that longer exposures of T cells to infected DCs resulted in larger bacterial captures (not shown), but as T cells also destroy the uptaken bacteria very quickly, quantification of bacterial transinfection occurring during longer DC/T cell time contacts proved to be difficult. Gentamicin survival assay is a very sensitive method to quantify T cell transinfection because it is able to detect one single infecting bacterium²¹. After incubation with gentamicin that kill just extracellular bacteria, T cells are isolated and lysed to seed on bacteria medium agar plates. The isolation of T cells after forming conjugates with DCs is a critical step within the protocol. Only experiments with less than 2% of contaminants should be taken into account. DC contamination can be measured by flow cytometry and CFUs corresponding to low DC contamination should be subtracted. Alternatively, CD4⁺ T cells purity can be improved by using cell sorting.

Another approach to quantify T cell transinfection is by flow cytometry, using GFP expressing bacteria and labelling the extracellular bacteria with a compatible fluorophore. One limitation of this approach is that bacteria have to express a GFP that is sufficiently bright for detecting infected cells against the autofluorescence background. Alternatively, bacteria could be stained before infecting DCs with a cell tracker. Another approach would be staining the extracellular bacteria, permeabilizing the T cells, then labelling all the bacteria (intracellular + extracellular) with a different fluorochrome.

Regarding future directions of this protocol, we are trying to set up a protocol to quantify the number of T cells that captured bacteria after longer exposition to infected DCs, by using bacteria decorated with magnetic particles. T cells capturing bacteria would retain the magnetic particles and therefore it should be easy to isolate them by using magnets.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2011-29450, BFU2008-04342/BMC from the Spanish Ministry of Science and Innovation and PIES2010201046 from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

References

1. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. **449** (7164), 819-826 (2007).
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science (1989).
3. Pancer, Z., & Cooper, M. D. The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*. **24**, 497-518 (2006).
4. Rhoades, R. A., & Bell, D. R. *Medical Physiology*. Lippincott Williams & Wilkins (2012).
5. Cossart, P. Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*. **304** (5668), 242-248 (2004).
6. Kaufmann, S. H., & Schaible, U. E. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Current Opinion in Immunology*. **17** (1), 79-87 (2005).
7. Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*. **124** (4), 715-727 (2006).
8. Dustin, M. L. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunological Reviews*. **221**, 77-89 (2008).
9. Calabia-Linares, C., Robles-Valero, J., *et al.* Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *Journal of Cell Science*. **124** (5), 820-830 (2011).
10. Westcott, M. M., Henry, C. J., Cook, A. S., Grant, K. W., & Hiltbold, E. M. Differential susceptibility of bone marrow-derived dendritic cells and macrophages to productive infection with *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*. **9** (6), 1397-1411 (2007).
11. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. **100** (5), 587-597 (2000).
12. Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gómez, M., *et al.* HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathogens*. **6** (3), e1000740 (2010).
13. Mittelbrunn, M., & Sanchez-Madrid, F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews. Molecular cell biology*. **13** (5), 328-335 (2012).
14. McElroy, D. S., Ashley, T. J., & D'Orazio, S. E. Lymphocytes serve as a reservoir for *Listeria monocytogenes* growth during infection of mice. *Microbial Pathogenesis*. **46** (4), 214-221 (2009).
15. Salgado-Pabon, W., Celli, S., *et al.* Shigella impairs T lymphocyte dynamics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110** (12), 4458-4463 (2013).
16. Cruz Adalia, A., Ramirez-Santiago, G., *et al.* T cells kill bacteria captured by transinfection from dendritic cells and confer protection in mice. *Cell Host and Microbe*. **15** (5), 611-622 (2014).
17. Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., & Carbone, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and Cell Biology*. **76** (1), 34-40 (1998).
18. Matheu, M. P., Sen, D., Cahalan, M. D., & Parker, I. Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (17) (2008).
19. Inaba, K., Inaba, M., *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*. **176** (6), 1693-1702 (1992).
20. Thöne, F., Schwanhäusser, B., Becker, D., Ballmaier, M., & Bumann, D. FACS-isolation of *Salmonella*-infected cells with defined bacterial load from mouse spleen. *Journal of Microbiological Methods*. **71** (3), 220-224 (2007).
21. Vaudaux, P., & Waldvogel, F. A. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **16** (6), 743-749, (1979).
22. Zhang, X., Goncalves, R., & Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan [et al.]*. Chapter 14, Unit 14.1 (2008).

23. Bedoya, S. K., Wilson, T. D., Collins, E. L., Lau, K., & Larkin, J. Isolation and th17 differentiation of naïve CD4 T lymphocytes. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (79), e50765 (2013).
24. Basu, S., Campbell, H. M., Dittel, B. N., & Ray, A. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (41) (2010).
25. Foucar, K., Chen, I. M., & Crago, S. Organization and operation of a flow cytometric immunophenotyping laboratory. *Seminars in diagnostic pathology*. **6** (1), 13-36 (1989).
26. Itano, A. A., & Jenkins, M. K. Antigen presentation to naïve CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology*. **4** (8), 733-739 (2003).

Title: Conventional CD4⁺ T cells cross-present bacterial antigens to CD8⁺ T cells inducing cytotoxic and memory response.

Authors: Aránzazu Cruz-Adalia^{1*}, Guillermo Ramirez-Santiago¹, Jesús Osuna-Pérez¹, Mónica Torres-Torresano¹, Virginia Zorita³, Ana Martínez-Riaño⁴, Viola Boccasavia⁴, Aldo Borroto⁴, Gloria Martínez del Hoyo³, José María Gozález-Granado^{3,5}, Balbino Alarcón⁴, Francisco Sánchez-Madrid⁶ and Esteban Veiga^{1,2*}

Affiliations: ¹Dept Molecular & Cellular Biology; Centro Nacional de Biotecnología; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC); Darwin 3, 28049, Madrid, Spain

²Hospital de Santa Cristina; Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, 28009, Madrid, Spain

³Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029, Madrid, Spain

⁴Dept Cell Biology and Immunology; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO); Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

⁵Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

⁶Hospital de la Princesa; Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, 28006 Madrid, Spain

*** Correspondence to:**

Esteban Veiga, PhD, and Aranzazu Cruz Adalia, PhD
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
Darwin 3, 28049, Madrid, Spain
Phone: +34 915854548
E-mail: acruz@cnb.csic.es
E-mail: eveiga@cnb.csic.es

One Sentence Summary: transphagocytic CD4⁺ T cells are *bona fide* antigen-presenting cells with potential use as novel antitumor agents.

Abstract:

It was recently shown that CD4⁺ T cells capture and kill bacteria from infected DC in a process termed transinfection. In the present work, we further tested the traditional boundary between innate and adaptive immunity and show that bacteria-capturing conventional $\alpha\beta$ CD4⁺ T cells, the paradigm of adaptive immunity, process and cross-present bacterial antigens to naïve CD8⁺ T cells, which massively proliferate and become cytotoxic. We also provide evidence that CD4⁺ T cell-directed cross activation of naïve CD8⁺ T cells also occurs *in vivo*, during the course of an infection, demonstrating that $\alpha\beta$ CD4⁺ T cells are *bona fide* antigen presenting cells. Moreover, $\alpha\beta$ CD4⁺ T cells-mediated antigen presentation induces the generation of central memory CD8⁺ T cells with low levels of PD-1. We therefore tested the therapeutic potential of bacterial-capturing antigen-presenting CD4⁺ T cells using an aggressive melanoma as a proof of concept tumour model. We provide evidence that bacterial-capturing antigen-presenting CD4⁺ T cells induce strong protective anti-tumor immune response by cross-priming CD8⁺ T cells, highlighting the potential of CD4⁺ T cells in cancer immunotherapy.

Introduction.

The immune response against intracellular bacteria pathogens (such as *L. monocytogenes*) and cancer are similar in many aspects requiring the participation of CD8⁺ effector T cells¹. Specific T cell receptors (TCRs) CD8⁺ T cells will recognize their partner antigens exposed in the major histocompatibility complex I (MHC-I) on the surface of the antigen-presenting cells (APC)². Mainly all cells express MHC-I, and thus, malignant (expressing neo-antigens) or infected (expressing antigens from the pathogen) cells could be eliminated by effector CD8⁺ T cells. However, antigen-specific CD8⁺ T cells, in order to directly eliminate malignant or infected cells must be first activated (or “primed”) by ‘professional’ APC³. Antigen presentation of exogenous antigens, like bacterial antigens, by APC via MCH-I is called cross-presentation^{3,4}. This process is crucial for CD8⁺ T cell responses against infectious diseases and cancer. Although multiple cell types are being described to be able to cross-present antigens, it is carried out *in vivo* mainly by dendritic cells (DC), which are described to be the most efficient APC³⁻⁵. Antigen presentation occurs during the formation of the immune synapse (IS), formed by the intimate contact of T cells and antigen loaded APC and organized into concentric rings of multimolecular assemblies called supramolecular activation cluster (SMAC)⁶. After activation, some of the CD8⁺ T cells develop into memory cells, which will respond faster and more efficiently against later infections⁷ and are of major relevance in tumor immunotherapies^{8,9}. The main APCs involved in memory CD8⁺ T cell generation are DCs which therefore can be used as cellular therapy for cancer vaccination¹⁰. Other immunotherapies that are providing clear survival benefits are based in the use the so-called checkpoint inhibitors (antibodies anti- PD-1, PD-1L, or CTLA-4), which block the CD8⁺ T cell inhibition promoted by the immunosuppressive ambient of the tumors¹¹. These immunotherapies however, provide clinical benefit to only 25%–30% of

patients and in addition, various cancers present resistances¹². It is therefore necessary the appearance of novel strategies to improve the antitumor abilities of the immunotherapies¹³. It has been observed that CD4⁺ T cells are also required for the generation of memory CD8⁺ T cells^{14,15}. However, the indispensable requirement of CD4⁺ T cells for the generation of memory CD8⁺ T cells is still matter of debate¹⁶. It has been proposed that the interaction of CD40 ligand (CD40L) on the surface of CD4⁺ T cells with CD40 on DCs increases the ability of DCs to activate CD8⁺ T cells and generate memory¹⁶⁻¹⁸. Nevertheless, several studies show that CD40-CD40L interaction is not necessary to generate memory CD8⁺ T cells upon bacterial infections^{19,20}.

Recently, it has been shown that conventional $\alpha\beta$ CD4⁺ T cells can efficiently capture bacteria from DC through a process called transinfection²¹. As this process is driven by T cells and not by bacteria²¹, it would be more appropriate to term it transphagocytosis. Transphagocytic (ti) CD4⁺ T cells kill internalized bacteria in a manner reminiscent of innate immune cells, contributing to the early immune response²¹, raised the question whether tiCD4⁺ T cells could act as real APC. In fact, it has already been suggested that human T cells can present soluble antigens and activate other T cells *in vitro*^{22,23}, but the general thought is that in physiological situations they are not APC due to their incapacity to capture antigens. Here, we show that conventional $\alpha\beta$ tiCD4⁺ T cells, are real APC able to efficiently cross-prime naïve CD8⁺ T cells, activating them and generating central memory CD8⁺ T cells, a population directly involved in antitumor fight²⁴. These results expand our knowledge on CD4⁺ T cell functions, blurring the separation between innate and adaptive immunity. Moreover, we tested whether these “novel” abilities of tiCD4⁺ T cells, together with their proinflammatory nature²¹, could have a role in tumor elimination. We tested this hypothesis in a proof of concept model of

aggressive melanoma, and show that tiCD4^+ T cells induce a strong immunoprotective response in mice, highlighting the potential role of transphagocytic CD4^+ T cells as novel agent for cancer immunotherapy.

Results.

tiCD4⁺ T cells cross-prime naïve CD8⁺ T cells:

tiCD4^+ T cells (conventional CD4^+ T cells capturing bacteria by transphagocytosis) were generated as described in ²¹. Briefly $\alpha\beta$ tiCD4^+ T cells from OT-II transgenic mouse contacted bone marrow-derived DC (BM-DCs) infected with *Listeria*-OVA (*L. monocytogenes* expressing ovalbumin) ²⁵ or *Listeria*-WT (isogenic wild type strain) and decorated with OVAp-II antigen (to increase the transphagocytosis ²¹). Infected DC-T cell conjugate formation were allowed for 12h and then CD4^+ T cells (tiCD4^+ T cells) were re-purified by cell sorting (Supplementary Fig. 1A). In Supplementary Fig 1B, it is shown tiCD4^+ T cells capturing *L. monocytogenes* after 2h conjugate formation; quantification of bacteria capture/destruction was shown in ²¹. We tested the antigen-presenting capacity of tiCD4^+ T cells by incubating them with naïve CD8^+ T cells isolated from OT-I transgenic mice, which recognize an ovalbumin peptide (OVAp-I 256-264; SIINFEKL) in the context of MHC-I haplotype H-2K^b ^{26,27}. *Listeria*-OVA but not *Listeria*-WT, expressed OVA as revealed by WB (Supplementary Fig. 1C). Flow cytometry analysis of CD8^+ T cells (Fig 1A and Supplementary Fig. 1D) showed strong CD8^+ T cell proliferation starting two days after exposure to tiCD4^+ T cells (shown by CellTrace Violet dilution) ²⁸, but only in cells that contacted tiCD4^+ T cells capturing *Listeria*-OVA (from now we will refer them as *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells). This extremely proliferative population expressed high CD8 levels (Fig. 1A) and showed blast morphology (Supplementary Fig. 1E). CD8^+ T cells incubated

with *Listeria*-WT tiCD4^+ T cells nonetheless did not proliferate (Fig. 1A). We detected expression of T cell activation markers CD69 and CD25 on CD8^+ T cells incubated with *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells, but not with *Listeria*-WT tiCD4^+ T cells (Fig. 1B). *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells induced similar levels of CD8^+ T cell proliferation than BM-DC loaded with soluble OVAp-I or polyclonal T cell activation by CD3/CD28 antibodies. BM-DC infected with *Listeria*-OVA, however, induced low CD8^+ T cell proliferation, (Fig. 1C and Supplementary Fig. 1F). As an additional control, we analysed the activation, measured as expression of CD25, of *Listeria*-OVA and *Listeria*-WT tiCD4^+ T cells, which resulted the same, confirming that the activation of CD8^+ T cells was due to the antigen presentation ability of tiCD4^+ T cells and not by a difference in its activation state (Supplementary Fig. 1G). Furthermore, *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells did not promote proliferation of WT mouse CD8^+ T cells that do not recognize OVAp-I (Fig. 1D), while potently inducing proliferation of CD8^+ T cells from OT-I mice (Fig. 1A, C, D), which indicates the antigen specificity of this effect.

tiCD4⁺ T cells process bacterial antigens:

Even though we did not detect OVA in the extracellular medium (Supplementary Fig. 1C), *Listeria*-OVA could secrete non-detectable amounts of soluble OVA. To discern whether CD4^+ T cells capture OVA from the extracellular medium (soluble or associate to exosomes) or associated to bacteria by transphagocytosis, we allowed them to contact infected DCs, or we avoid DC-T cell contacts by using a polycarbonate barrier (transwell, TW) that impedes such cellular interactions but allows the passage of soluble material and exosomes (Supplementary Fig. 2A). Then, cell-sorted re purified CD4^+ T cell populations were used as APCs to stimulate OT-I CD8^+ T cells. Only CD4^+ T cells that contacted directly infected DCs were able to induce CD8^+

T cell proliferation (Supplementary Fig. 2B). Both, naïve and activated CD4⁺ T cell impeded to directly contact infected DC were unable to activate CD8⁺ T cells (Supplementary Fig. 2B), indicating tiCD4⁺ T cells captured OVA as bacteria-associated antigen and process bacteria as shown in Fig. 1.

tiCD4⁺ T cell-mediated antigen presentation to CD8⁺ T cells might involve endogenous processing of bacteria by tiCD4⁺ T cells or capture of MHC/antigen molecules from the DC surface²⁹. To discriminate among these pathways, we incubated CD4⁺ T cells with BM-DC infected with *Listeria*-WT or *Listeria*-OVA and loaded with soluble OVAp-I. We purified the tiCD4⁺ T cell population, which we used to stimulate naïve CD8⁺ T cells. If the mechanism involved MHC/antigen transfer or exogenous antigen peptide transfer from DC to CD4⁺ T cells, antigen capture from DC would activate CD8⁺ T cells similarly in both conditions (Supplementary Fig. 2C). We nonetheless found that *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells but not *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells caused strong activation of CD8⁺ T cells (Fig. 2A), which indicates that the majority of CD8⁺ T cell activation was due to antigen processing by tiCD4⁺ T cells. To confirm this statement, we used tiCD4⁺ T cells from AND transgenic mice that expressed only H-2K^k, or mixed background T cells that expressed H-2K^k and H-2K^b. The cells expressing H-2K^b, induced strong CD8⁺ OT-I T cell proliferation compared to cells expressing only the H-2K^k haplotype of MHC-I, indicating that antigen presented by MHC-I in tiCD4⁺ T cells was derived mainly from intracellular processing (Fig. 2B), and only a minor part by capturing MHC/antigen complexes from the DCs.

To exclude a possible contribution to antigen presentation by DC contamination (transphagocytosis occurs by intimate contacts between CD4⁺ T cells and DC), we incubated OT-I CD8⁺ T cells with tiCD4⁺ T cells of pure H-2K^{k/k} or mixed H-2K^{k/b} background

transphagocytosing *Listeria*-OVA from infected H-2K^{k/k} BM-DC (these DCs are not able to activate CD8⁺ T cells obtained from OT-I mice). Only H-2K^b tiCD4⁺ T cells induced CD8⁺ T cell proliferation (Fig. 2C) were stained with 25D1.16, an antibody specific for the H-2K^b/OVAp-I complex (Fig. 2D). Therefore, these data using DCs unable to activate OT-I CD8⁺ T cells, excluded any contribution of a possible DC contamination to CD8⁺ T cell activation and confirm that antigen presentation mediated by tiCD4⁺ T cells was derived from intracellular processing.

To further support the antigen presentation capacity of CD4⁺ T cells after bacterial capture, we analysed the antigen presentation machinery in tiCD4⁺ T cells. Western blot analysis indicated that tiCD4⁺ T cells showed increased expression of Tap1 (Fig. 2E, F), a key protein in antigen presentation on MHC-I^{30,31}. Moreover, tiCD4⁺ T cells from Tap1 KO mice were highly impeded in antigen cross-presentation after bacterial capture (Fig. 2G), i.e. tiCD4⁺-induced CD8⁺ T cell proliferation was reduced when using CD4⁺ T cells from Tap1 KO mice. No difference in bacterial capture by transphagocytosis was observed in Tap1 KO or WT cells (not shown). These data indicate that tiCD4⁺ T cells, at least partially, use the canonical cross presentation pathway described for DC.

tiCD4⁺ T cells establish immune synapses with naïve CD8⁺ T cells:

Listeria-OVA transphagocytosis by CD4⁺ T cells led to increased MHC-I expression (H-2K^b), accumulation of H-2K^b coupled to OVAp-I antigen (of bacterial origin), and expression of co-stimulatory receptor ligands such as CD86³² (Fig. 3A-C); these results are compatible with antigen cross-presentation through the MHC-I pathway. OVAp-I expression on H-2K^b appears 48 h post-transphagocytosis (Fig. 3C), which corroborates intracellular processing of internalized

bacteria. The ensuing activation of CD8⁺ T cells appeared to involve formation of CD4⁺/CD8⁺ T cell conjugates (Supplementary Fig. 1D), indicative of immune synapse (IS) generation, a hallmark of T cell activation by APC^{6,33}. A mature IS is structured as multi-molecular concentric rings termed supra-molecular activation clusters (SMAC). The central zone of these SMAC bears MHC-TCR complexes and the peripheral zone (pSMAC) appears as a ring-like structure of adhesion molecules and F-actin^{6,34,35}. Immunofluorescence analysis confirmed that naïve CD8⁺ T cells formed mature IS after exposure to *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (Fig. 3D, Supplementary Movie 1). These tiCD4⁺/CD8⁺ T cell conjugates showed TCR (T cell receptor) complex in the cSMAC and accumulation of polymerized actin in the pSMAC. In the infrequent cases that *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells formed conjugates with CD8⁺ T cells, we found no evidence of formation of such SMAC structures (Fig. 3E).

We tested the cytotoxic capacity of CD8⁺ T cells and found that activation of CD8⁺ T cells by antigen-presenting *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells enabled them to eradicate OVAp-I-expressing EL-4 lymphoma target cells³⁶ (Fig. 3F).

These *in vitro* data show that tiCD4⁺ T cells are professional APC that capture bacteria, degrade them and activate naïve CD8⁺ T cells through a canonical cross-presentation pathway inducing a cytotoxic response.

tiCD4⁺ T cells cross-prime naïve CD8⁺ T cells in vivo:

To test whether tiCD4⁺ T cells (previously transphagocytosing bacteria *in vitro*) also activate naïve CD8⁺ T cells *in vivo*, we isolated naïve CD8⁺ T cells from OT-I mice expressing the CD45.1 allele marker, stained them *ex vivo* with a cell proliferation marker and transferred them together with tiCD4⁺ T cells into C57BL/6/CD45.2⁺ recipient mice, to elicit an immune response.

CD8⁺CD45.1⁺ T cells isolated from spleen proliferated in response to *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells but not to *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells (Fig. 4A-B).

Moreover, to further confirm whether CD4⁺ T cells capture bacteria and cross-present antigens *in vivo*, during the course of a bacterial infection, bone marrows of recipient C57BL/6 mice were transplanted with stem cell progenitors of H-2K^k haplotype. These reconstituted mice would have APCs not be able to cross-prime OT-I CD8⁺ T cells. One month later, AND CD4⁺ T cells (H-2K^b or H-2K^k) were adoptively transferred into recipient mice, together with OT-I CD8⁺CD45.1⁺ T cells, and MCC peptide (favouring bacterial capture by CD4⁺ T²¹; Supplementary Fig 3A). Recipient mice were tested for the absence of H-2K^b haplotype in the myeloid lineage (Supplementary Fig. 3B) and challenged with *Listeria*-OVA. Only mice receiving H-2K^b CD4⁺ T cells activated OT-I CD8⁺CD45.1⁺ T cells (Supplementary Fig. 3C-E), confirming that transphagocytosis and antigen presentation mediated by tiCD4⁺ T cells occurs *in vivo* during the course of a bacterial infection.

Note that we have chosen the model of reconstituted H-2K^k mice because DC cells from B2m (beta-2 microglobulin) KO mice, expressed however, reduced levels of MHC-I our data not shown and³⁷ and more over, were able to activate OT-I CD8⁺ T cells *in vitro* (data not shown).

tiCD4⁺ T cells generate central memory CD8⁺ T cells during Listeria infection:

In order to analyze the role of antigen cross-presentation achieved by tiCD4⁺ T cells in physiological conditions, in the context of endogenous repertoire of WT CD8⁺ T and CD4⁺ T cells (not using OVA antigen-specific models), we performed an adoptive transfer experiment summarized in Supplementary Fig. 4A. Rag1 KO recipient mice (deficient in lymphocytes) were divided in three groups. One group was transferred with CD4⁺ T cells from C57BL/6 (WT) mice,

229 other with CD4⁺ T cells from Tap1 KO mice (deficient in antigen presentation; Fig. 2G) and the
 230 last one did not receive any CD4⁺ T cell. All mice were also transferred with CD8⁺ T cells from
 231 C57BL/6 (WT) mice the same day, and the day after, all mice were infected with a low dose
 232 (1000 bacteria/mice) of *L. monocytogenes*. Mice from each group were sacrificed at day 5, 12
 233 and 30 after bacterial challenge and the phenotype of CD8⁺ T cells from the spleen were
 234 analyzed by flow cytometry (Supplementary Fig. 4B). At day 5 after bacterial challenge, no
 235 differences were detected in the CD8⁺ T cell populations from all groups (data not shown). 12
 236 days after challenge, the group transferred with WT CD4⁺ T cells shows 3 times more
 237 CD3⁺CD8⁺ CD44⁺ CD62L⁻ CD127⁺ T cells than the other two groups (Fig. 4C-D). CD127, the
 238 receptor of IL-7, has been described as a marker of memory CD8⁺ T cells^{38,39}. These data
 239 indicate that antigen presentation mediated by tiCD4⁺ T cells plays a major role in the generation
 240 of pre-memory CD8⁺ T cells. Moreover, PD-1 expression in pre-memory CD8⁺ T cells was
 241 highly reduced in the group transferred with WT CD4⁺ T cells (Fig. 4E). Note that the expression
 242 of CD40L was similar in polyclonal activated CD4⁺ T cells from WT and Tap1 KO mice
 243 (Supplementary Fig. 4C), and it is known that both Tap1 KO and WT CD4⁺ T cells secrete
 244 similar levels of IFN- γ in the presence of IFN- γ ⁺ NK cells⁴⁰ as it is the case of Rag1 KO mice
 245^{41,42}, indicating that the differences observed between the groups transferred with WT or Tap-1
 246 KO CD4⁺ T cells are due to the difference in their antigen presentation ability. The results
 247 analyzed 30 days after bacterial challenge were similar. The group transferred with WT CD4⁺ T
 248 cells shown larger levels (3-4 times) of central memory CD8⁺ T cells
 249 (CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L^{high}CCR7⁺CD127⁺) than what was observed in the other groups (Fig.
 250 4F-G). CCR-7 is expressed by central memory CD8⁺ T cells⁴³ and we noticed that the
 251 expression of this marker was reduced on CD8⁺CD44⁺CD62L^{high} population in the mice

transferred with TAP-1 KO CD4⁺ T cells compared with mice transferred with WT CD4⁺ T cells (Supplementary Fig. 4D). The expression of PD-1 on CD3⁺CD8⁺CD44⁺ T cells in the group transferred with WT CD4⁺ T cells was also reduced compared with the other groups (Fig. 4H), indicating that memory CD8⁺ T cells generated by CD4⁺ T cell antigen presentation could be more resistant to exhaustion. Note that the group transferred with Tap-1 KO CD4⁺ T cells behaved similarly to the group non-transferred with CD4⁺ T cells, indicating again tiCD4⁺ T cells play a direct role in CD8⁺ T cell memory generation by their antigen presentation ability and not by indirect DC stimulation.

To analyze the cytotoxic response of these memory CD8⁺ T cells generated *in vivo*, mice from all three groups were also re-challenged (50 days after first infection) with LD50 of *L. monocytogenes* (50 000 bacteria/mice) and 2 days later, bacterial load at the spleen was quantified by colony counting (Supplementary Fig. 4). As observed (Fig. 4I), the group transferred with WT CD4⁺ T cells eliminate more bacteria, indicating that memory CD8⁺ T cells generated by CD4⁺ T cell antigen presentation were also efficient in bacterial clearance during secondary infections.

Antitumor immunotherapy potential of tiCD4⁺ T cells:

The observation that transphagocytosis converts conventional $\alpha\beta$ CD4⁺ T cells into potent APCs, generating cytotoxic and memory CD8⁺ T cells expressing low levels of PD-1, together with their highly pro-inflammatory profile²¹ provided a starting point from which to develop antitumour immunotherapeutic strategies^{11,44}. To explore the therapeutic potential of tiCD4⁺ T cells as APC, we tested whether tiCD4⁺ T cells-mediated activation of naïve CD8⁺ T cells confer protection against tumour formation in a murine model of malignant melanoma. We inoculated

the murine melanoma cell line B16-OVA⁴⁵⁻⁴⁷ subcutaneously into C57BL/6 mice; the same day, naïve CD8⁺ T cells from OT-I mice were adoptively transferred by a single intravenous injection with PBS (group 1), *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells (group 2) or *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (group 3) (Fig 5A). All control mice treated with vehicle (PBS) or *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells developed tumours within 11 days of B16-OVA injection (Fig. 5B). Administration of *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells prevented tumour formation in 6 of 9 mice and delayed tumour formation in one mouse; that is, vaccination with antigen-presenting tiCD4⁺ T cells conferred protection against melanoma in 7 of 9 cases (Fig. 5B). These results of this proof of concept experiment show that cross-presentation by tiCD4⁺ T cells can be used *in vivo* to prime CD8⁺ effector T cells against tumours.

Discussion.

In conclusion, we show that cross-presentation of bacterial antigens, thought to be limited to professional APC of the innate immune system⁴⁸, are recapitulated by conventional CD4⁺ T cells, considered the paradigm of cells of the adaptive immune response. This finding blurs the traditional boundary between innate and adaptive immunity, as do other specialized, non-conventional, populations of lymphocytes⁴⁹.

These “novel” antigen presenting abilities of conventional CD4⁺ T cells could have a role in secondary immune responses, where important numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells responding to a certain pathogen are present. The ability of T lymphocytes to present soluble antigens and activate other T cells was previously described^{22,23}, but these experimentations were not able to show a role of T cell-dependent antigen presentation in the context of physiological situations. It was thought that the incapacity to capture antigens by T cells made them not suitable to be APC

298 *in vivo* ²². We, however, have recently shown that CD4⁺ T cells are able to capture bacteria by
299 transphagocytosis and destroy uptaken pathogens ²¹. Moreover, now we show that tiCD4⁺ T cells
300 process and present in their own MHCs the bacterial peptides inducing a potent activation of
301 CD8⁺ T cells. We have demonstrated that the vast majority of the CD8⁺ T cell activation is due
302 to antigen processing inside tiCD4⁺ T cells and only a minor part is due to MHC/antigen
303 complexes acquired from DC during DC/T cell contact. In agreement with our findings, a recent
304 microscopy-based study show that during the course of viral infection, CD8⁺ T cell activation
305 occurs after CD4⁺ T cell contacts with infected DCs. The early events after infection included
306 DC/CD4⁺ T cell contacts and rarely DC/CD8⁺ T cell contacts, being the CD4⁺ T/CD8⁺ T cell
307 contacts the predominant later events ⁵⁰.

308 We also provide evidence that CD4⁺ T cells-dependent antigen presentation generates central
309 memory CD8⁺ T cells (CD44⁺CD62L^{high}CCR7⁺) *in vivo*, during the course of bacterial infections,
310 in a natural repertoire environment. Interestingly, memory CD8⁺ T cells induced by tiCD4⁺ T
311 cells expressed lower levels of PD-1 compared with those activated by professional phagocytes
312 (mainly DCs). These observations expand our knowledge about the roles of CD4⁺ T cells during
313 CD8⁺ T cells memory generation. It is well known that CD4⁺ T cells are necessary for CD8⁺ T
314 cell memory generation following acute pathogen infection ¹⁶, but the mechanisms by CD4⁺ T
315 cells are involved are still not totally clear. It has been proposed that the interaction of CD40
316 ligand (CD40L) on the surface of CD4⁺ T cells with CD40 on DCs increases the ability of DCs
317 to activate CD8⁺ T cells and generate memory ¹⁶⁻¹⁸. Nevertheless, other studies show that CD40-
318 CD40L interaction is not necessary to generate memory CD8⁺ T cells upon bacterial infections
319 ^{19,20}. In all cases the antigen presentation to CD8⁺ T cells was supposed to be carried out

exclusively by DCs, and here we show, for the first time, that CD4⁺ T cells can directly present bacterial antigens to CD8⁺ T cells and promote memory response.

The ability of tiCD4⁺ T cells to potently activate cytotoxic CD8⁺ T cells expressing low levels of PD-1, together with their vigorous pro-inflammatory nature ²¹ could bypass the immunosuppressive ambient of solid tumors ^{51,52} and it could be exploited *in vivo* to activate naïve CD8⁺ T cells against tumours. Despite the success of antibodies-based therapy against the tumor checkpoint blockade, more than 50% of cancer patients fail to respond ⁵³. The advent of new technologies improving the ability to detect tumor antigens, enhanced the possibility to attack the tumors by novel immunotherapies ^{54,55}, for example by its combination with effective antigen presentation systems ¹⁰. In this context, we performed a proof of concept experiment showing that tiCD4⁺ T cells are effective APCs impeding the implant of an aggressive melanoma (B16-OVA). Note that protection against B16 tumour was achieved with a single injection of tiCD4⁺ T cells (Fig. 4C), whereas DC-based vaccination required several injections for similar protection ⁵⁶, highlighting the potent cross-priming activity of tiCD4⁺ T cells. The data presented here thus pave the way for further research the role of conventional CD4⁺ T cells in innate immunity (and their interactions with other immune cells), as well as their potential use as a new generation of tumour immunotherapy.

Materials and Methods.

Mice:

Wild-type C57BL/6 mice, C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β)425Cbn/J OT-II mice expressing a T cell receptor (TCR) specific for OVA peptide 323–339 in the context of MHC class II (I-Ab)⁵⁷, and C57BL/6-Tg(Tcr α Tcr β)1100Mjb/J OT-I mice expressing TCR specific for OVA peptide 257–264 in the context of H-2Kb^{26,27} were purchased from Jackson Laboratory (stock number 004194 and 003831, respectively). AND-TCR transgenic mice recognizing moth cytochrome c 88-103 (ANERADLIAYLKQATK) (MCCp) on I-E^k, expressing H-2K^b, H-2K^k or both haplotypes were described elsewhere^{58,59}. C57BL/6J 129S2- Tap1tm1Arp/J (Tap1^{-/-}) mice were kindly provided by Dr. Margarita del Val⁶⁰. C57BL/6J 129S7-Rag1tm1Mom/J (Rag1^{-/-}) mice⁶¹, lacking B and T lymphocytes, were acquired from Jackson Laboratory. Male or female mice aged 8 to 12 weeks were used for experiments. Mice were kept in the specific-pathogen-free (SPF) unit at the Universidad Autónoma de Madrid School of Medicine, and Centro Nacional de Biotecnología (CNB) animal facilities, and for some experiments, in the SPF unit at the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Experimental procedures were approved by the Committee for Research Ethics of the Universidad Autónoma de Madrid, CNIC and CNB, and experiments were conducted under the supervision of respective Heads of Animal Welfare and Health in accordance with Spanish and European guidelines. All the procedures were approved by the Madrid local authority with a project number PROEX 431/15.

Bacterial strains:

Bacterial strains used were *Listeria monocytogenes*-OVA (pPL2-LLO-OVA), a *Listeria* strain that expresses OVA protein²⁵, and its WT isogenic strain *L. monocytogenes* 10403S. Bacteria were grown O/N in brain-heart infusion (BHI) medium at 37°C, then diluted, recovered at the

364 middle of the logarithmic growth phase ($DO_{600nm}=0.5$), and washed in PBS before intravenous
365 (iv) inoculation.

366 Cells:

367 Bone marrow dendritic cells (DC) were generated as described ²¹. Phenotypic characteristics
368 were assessed by flow cytometry on day 10 ($CD11c^+$, IA/IE^+ , $Gr1^+$) to ensure correct
369 differentiation. Maturation was induced with 20 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) for 24 h.

370 Primary mouse $CD4^+$ T cells were obtained from single-cell suspensions of lymph nodes (LN)
371 and spleens. Cell suspensions were incubated with biotinylated antibodies to CD8, IgM, B220,
372 CD19, MHC class II (I-Ab), CD11b, CD11c, and DX5, and then with streptavidin microbeads.
373 $CD4^+$ T cells were negatively selected in an auto-MACS Pro Separator (Miltenyi Biotec). To
374 isolate naïve $CD8^+$ T cells from the indicated mice, spleen cell suspensions were incubated with
375 the same biotinylated antibodies, with anti-CD25 and -CD4 antibody instead of CD8.

376 The EL-4 lymphoma cell line was maintained in RPMI 1640 medium (Fisher Scientific),
377 supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 0.1 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml
378 streptomycin (Lonza) and 0.05 mM 2-mercaptoethanol.

379 The OVA-expressing B16 melanoma cell line was maintained in RPMI 1640 medium with 0.4
380 mg/ml of geneticin. Antibiotic was removed by washing cells 48 h before injection into mice.

381 Antibodies:

382 Antibodies to mouse proteins included anti-CD69, -CD25, -CD4, -CD8, -CD11c, -IA/IE, -Gr1, -
383 CD3, -PD-1, -CD127, -CD44, -CD62L (BD and Immunostep), biotinylated antibodies to CD45.1,
384 CCR-7, CD3, CD4, CD8, CD28, IgM, B220, CD19, MHC class II (I-Ab), CD11b, CD11c DX5,
385 CD25 and CD16/CD32 (BD and Immunostep), and FITC-conjugated anti-tubulin (Santa Cruz).
386 Mouse allophycocyanin (APC)-labeled 25-D1.16 monoclonal antibody (specific for

387 SIINFEKL/H-2K^b) was purchased from eBioscience. Anti-TAP-1 (M-18), -ERK-2 and -lamin B
388 were from Santa Cruz. Anti-OVA antibody was provided by Dr. David Sancho (CNIC).
389 Secondary donkey anti-mouse and goat anti-hamster antibodies conjugated to AlexaFluor488,
390 647, or 568 were purchased from Life Technologies; peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG
391 and goat anti rabbit were from Thermo Scientific.

392 Reagents:

393 OVAp-II (OVA 323-339; ISQAVHAAHAEINEAGR) and OVAp-I (OVA 257-264; SIINFEKL)
394 were generated at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC, Madrid) and Centro
395 Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid). Moth cytochrome c (MCCp) 88-103 peptide
396 (ANERADLIAYLKQATK) was purchased from GenScript. Other reagents used were mouse
397 GM-CSF (Peprotech), LPS (Sigma-Aldrich), streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec),
398 streptavidin-PercP (BectonDickinson), poly-L-lysine (Sigma-Aldrich), CellTrace Violet,
399 AlexaFluor568-phalloidin (both from Life Technologies), 7-AAD Viability Staining Solution
400 (eBiosciences), and Live/Dead Fixable dead cell stain (Thermo Fisher scientific).

401 CD4⁺ T cell transphagocytosis:

402 CD4⁺ T cells from OT-II mice transphagocytosed *Listeria*-OVA or *Listeria*-WT as described ^{21,62}.
403 Briefly, bacteria-infected and OVAp-II-loaded (to improve transphagocytosis) ²¹ BM-DC from
404 WT C57BL/6 mice were allowed to form conjugates with CD4⁺ T cells. Both, BM-DC cells
405 from WT C57BL/6 mice and CD4⁺ T cells from OT-II mice expressed MHC-I haplotypes b and
406 k, H-2K^{b/k}. In some experiments, BM-DC and CD4⁺ T cells were produced/isolated from AND
407 transgenic mice expressing H-2K^{b/k}, or H-2K^b negative (H-2K^{k/k}). In these experiments BM-DC
408 were loaded with MCCp to improve transphagocytosis. After 3 h of DC/T cell conjugate
409 formation, gentamicin (100 µg/ml) was added to cultures eliminate extracellular bacteria. 24 h

410 later (in some experiments, 48 h), tiCD4⁺ T cells were purified by cell sorting (FACS Synergy;
411 iCyt). In some experiments, conjugate formation was conducted in absence of antigen. BM-DC
412 cells were separated from CD4⁺ T cells with permeable polycarbonate barrier with 0,4 µm of
413 pore size (transwell) in some experiments (Supplementary Fig. 2A).

414 Western-Blotting:

415 SDS-PAGE and Western-Blotting were carried out using standard procedures. Samples from to
416 2x10⁸ bacteria were loaded in each lane (BA). The extracellular medium (SN) was concentrated
417 50x using 10 kDa centricons (Millipore) before loading in the SDS-PAGE gels. The anti-OVA
418 polyclonal antibody used was detected using secondary antibodies coupled to HRP and revealed
419 by chemiluminescence.

420 CD8⁺ T cell proliferation assays:

421 Cell-sorter purified tiCD4⁺ T cells were incubated with naïve OT-I mouse CD8⁺ T cells. Naïve
422 CD8⁺ T cells were previously stained with CellTrace Violet to quantify proliferation by flow
423 cytometry (FACSARIA; BD). In every cell division, proliferating population loss fluorescence,
424 observed by a shift to the left of the histogram²⁸. Only live cells (negatively stained for 7AAD)
425 were analysed. As positive controls, OT-I CD8⁺ T cells were incubated with OVAp-I loaded
426 BM-DCs or with antibodies against CD3 (5µg/ml coated on plate) and CD28 (soluble 2µg/ml).
427 To analyse CD8⁺ T cell proliferation induced by injected tiCD4⁺ T cells *in vivo*, 5 x 10⁶ naïve
428 CD8⁺ T cells (from CD45.1⁺ OT-I mice), stained with CellTrace Violet, were injected *iv* into
429 recipient mice (CD45.2⁺ C57BL/6). After 24 h, tiCD4⁺ T cells were adoptively transferred into
430 mice. Spleens were isolated 3 days after the second inoculation to analyse CD8⁺CD45.1⁺ T cell
431 proliferation by flow cytometry.

432 In order to test transphagocytosis and antigen presentation by CD4⁺ T cells in the context of a
433 bacterial infection *in vivo*, we performed bone marrow transplantation (BMT) experiment
434 (Supplementary Fig. 3A). C57BL/6 mice were γ -irradiated with 10 Gy and transplanted with 3.8
435 x 10⁶ of bone marrow cells from H-2K^k mice. After 30 days, CD4⁺ T cells isolated by cell
436 sorting from the lymph nodes of AND mice (H-2K^b or H-2K^k), were adoptively *iv* transferred (4
437 x 10⁶ cells/mouse), together with CD8⁺ T cells from OT-I mice (4 x 10⁶ cells/mouse) and MCC
438 peptide (15 μ g/mouse). These CD8⁺ T cells that expressed the CD45.1 marker, were stained with
439 CellTrace violet before being transferred into recipient mice. In addition, recipient mice were *iv*
440 challenged with *Listeria*-OVA (10⁴ bacteria/mouse). 5 days after infection the spleens were
441 isolated and the proliferation of the injected CD8⁺ T cells from OT-I mice (CD45.1⁺ cells) was
442 detected by flow cytometry (CellTrace violet decay). As control of bone marrow elimination in
443 recipient mice, the presence of H-2K^b allele was tested and only negative animals were analysed.

444 *Analysis of memory CD8⁺ T cells during Listeria infection in vivo:*

445 Rag-1^{-/-} recipient mice were divided into three experimental groups. 1) Mice were injected *iv*
446 with 5 x 10⁵ naïve CD8⁺ T cells from WT C57BL/6 mice; 2) with 5 x 10⁵ naïve CD8⁺ T cells
447 from WT C57BL/6 mice and 5 x 10⁵ CD4⁺ T cells from Tap-1 KO mice; 3) with 5 x 10⁵ naïve
448 CD8⁺ T cells and 5 x 10⁵ CD4⁺ T cells both from WT C57BL/6 mice. Naïve CD8⁺ T cells were
449 previously isolated by cell sorting from spleens. One day after cell transfer, *Listeria*-WT were
450 injected intravenously (*iv*) (1000 bacteria/mouse). Spleens were harvested after 5, 12 and 30 days
451 to analyze phenotype of CD8⁺ T cells by flow cytometry. Splenocytes were stained with
452 antibodies against CD8, CD3, CD62L, CD44, CD127, PD-1 and CCR-7 conjugated with
453 different fluorochromes. Mice were secondary challenged with 5 x 10⁴ *Listeria*-WT and 2 days
454 later, CFUs from spleens were counted in agar plates.

455 Immunofluorescence microscopy:

456 tiCD4⁺ and naïve CD8⁺ T cells were allowed to form conjugates (1 h), then fixed with 4%
457 paraformaldehyde in PBS. CD8⁺ T cells were prestained with CellTrace Violet. Samples were
458 permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS before staining with indicated antibodies. F-actin
459 was detected using fluorescently-tagged phalloidin. Samples were visualised by confocal
460 microscopy (Leica TCS-SP5 microscope equipped with 63x lens, and controlled by Leica LAS
461 AF). Images were analysed with ImageJ software (NIH; Bethesda, MD).

462 Cytotoxicity assay:

463 Effector cytotoxic CD8⁺ T cells (CTL) were prepared from naïve CD8⁺ T cells (from OT-I mice)
464 activated with *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (7 days). CD8⁺ T cells from OT-I mice activated by
465 OVAp-I-loaded splenocytes were used as positive controls.

466 EL-4 cells were incubated alone or with 0.5 µM OVAp-I (1 h). After washing with PBS, OVAp-
467 I-loaded EL-4 cells were stained with 5 µM CellTrace Violet and unloaded EL-4 cells with
468 0.5 µM CellTrace Violet. After washing with culture medium (with FCS), the populations were
469 mixed and incubated with CTL at various ratios (5:1, 2:1, 1:1, 0.5:1 EL-4:CTL)(4 h), then
470 analysed by flow cytometry. To calculate specific cytotoxicity, we used the formula: $1 - (\% \text{ EL-4 CellViolet}^{\text{high}} / \% \text{ EL-4 CellViolet}^{\text{low}}) \times 100$ ³⁶. Relative cytotoxicity was calculated by
471 subtracting the specific cytotoxicity of the negative control (EL-4 cells incubated without CTL).

473 Anti-tumour assay (B16-OVA melanoma):

474 *Listeria*-WT CD4⁺ T cells (negative control) or *Listeria*-OVA CD4⁺ T cells were prepared as
475 above. At 24 h post-transphagocytosis, tiCD4⁺ T cells were reisolated by cell sorting and
476 resuspended in PBS. Naïve CD8⁺ T cells from OT-I mice were purified on magnetic columns as
477 above and resuspended in PBS. B16-OVA cells (5×10^5) were injected subcutaneously (sc) into

the mid right flank of C57BL/6 recipient mice. Mice were divided into three groups and adoptively transferred *iv* with PBS (group 1), 5×10^5 *Listeria*-WT tiCD4^+ T cells (group 2), or *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells (group 3). All groups were simultaneously adoptively transferred with 10^3 OT-I CD8^+ T cells in a single *iv* injection. Tumour growth was measured every 2–3 d with a dial calliper, and areas determined by multiplying length by width. Tumours grew quite flat, and measurement of the tumour volume was therefore unreliable. Experimental groups were assigned randomly and measurements were made in a double-blind manner. Mice were sacrificed when tumours reached 300 mm^2 , in accordance with endpoints of the European guidelines for experimental animals.

Statistics:

Regarding experiment in Fig. 5B, to test whether the new treatment has a significant reduction on the Odds Ratio of developing a tumour we used a one-sided Fisher's exact test to test the independence of the count of tumours and the treatment given (treatment; *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells, or controls; PBS vehicle or *Listeria*-WT tiCD4^+ T cells) as implemented in the R library exact 2x2. The hypothesis that the Odds Ratio is the same under both conditions (controls and treatment with *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells) was rejected with a p-value of 0.004525. In experiments shown in Fig. 4C, Fig. 4G, we used one-way analysis of variance (ANOVA) and multiple mean comparisons were corrected with Bonferroni test. Supplementary Fig. 1F data were analysed by two-way ANOVA and multiple mean comparisons were corrected with Bonferroni test. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

499 **Supplementary Materials**

500 Supplementary Fig 1. *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells activate OVA-recognizing CD8⁺ T cells

501 Supplementary Fig 2. OVA antigen presented by tiCD4⁺ T comes from degraded bacteria

502 Supplementary Fig 3. Cross-presentation of bacterial antigen by CD4⁺ T cells during *in vivo*
503 bacterial challenge

504 Supplementary Fig 4. CD4⁺ T cell-dependent antigen presentation induces central memory CD8⁺
505 T cells *in vivo*

506 Supplementary Movie 1. 3D rendering of an immunological synapsis formed by *Listeria*-OVA
507 tiCD4⁺ T cell and naïve OT-I CD8⁺ T cell

508

509

510

511

512

513 **References:**

- 514 1. Vance, R. E., Eichberg, M. J., Portnoy, D. A. & Raulet, D. H. Listening to each other:
515 Infectious disease and cancer immunology. *Science Immunology* **2**, eaai9339 (2017).
- 516 2. Neefjes, J. & Ovaa, H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune
517 system. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 769–775 (2013).
- 518 3. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic
519 cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 557–569 (2012).
- 520 4. Fehres, C. M., Unger, W. W. J., Garcia-Vallejo, J. J. & van Kooyk, Y. Understanding the
521 biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Front*
522 *Immunol* **5**, 149 (2014).
- 523 5. Leirião, P., del Fresno, C. & Ardavin, C. Monocytes as effector cells: Activated Ly-
524 6Chigh mouse monocytes migrate to the lymph nodes through the lymph and cross-
525 present antigens to CD8+T cells. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2042–2051 (2012).
- 526 6. Saito, T. & Batista, F. D. *Immunological Synapse*. **XV**, 1–255 (Springer, 2010).
- 527 7. Lauvau, G., Boutet, M., Williams, T. M., Chin, S. S. & Chorro, L. Memory CD8(+) T
528 Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends in Immunology* **37**,
529 375–385 (2016).
- 530 8. Klebanoff, C. A., Gattinoni, L. & Restifo, N. P. CD8+ T-cell memory in tumor
531 immunology and immunotherapy. *Immunol. Rev.* **211**, 214–224 (2006).
- 532 9. Gannon, P. *et al.* Rapid and continued T cell differentiation into long-term effector and
533 memory stem cells in vaccinated melanoma patients. *Clin. Cancer Res.*
534 clincanres.1708.2016 (2016). doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1708
- 535 10. Sabado, R. L., Balan, S. & Bhardwaj, N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell*
536 *Research* **27**, 74–95 (2017).
- 537 11. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle.
538 *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
- 539 12. D’Errico, G., Machado, H. L. & Sainz, B. A current perspective on cancer immune
540 therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med* **6**, 3
541 (2017).
- 542 13. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. & Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired
543 Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 707–723 (2017).
- 544 14. Janssen, E. M. *et al.* CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in
545 CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852–856 (2003).
- 546 15. Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8
547 T cell memory. *Science* **300**, 337–339 (2003).
- 548 16. Laidlaw, B. J., Craft, J. E. & Kaech, S. M. The multifaceted role of CD4(+) T cells in
549 CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol* **16**, 102–111 (2016).
- 550 17. Bennett, S. R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.
551 *Nature* **393**, 478–480 (1998).
- 552 18. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. T-cell
553 help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**,
554 480–483 (1998).
- 555 19. Montfort, M. J., Bouwer, H. G. A., Wagner, C. R. & Hinrichs, D. J. The development of
556 functional CD8 T cell memory after *Listeria monocytogenes* infection is not dependent on
557 CD40. *J. Immunol.* **173**, 4084–4090 (2004).

20. Hamilton, S. E., Tvinnereim, A. R. & Harty, J. T. *Listeria monocytogenes* infection overcomes the requirement for CD40 ligand in exogenous antigen presentation to CD8(+) T cells. *J. Immunol.* **167**, 5603–5609 (2001).
21. Cruz-Adalia, A. *et al.* T Cells Kill Bacteria Captured by Transinfection from Dendritic Cells and Confer Protection in Mice. *Cell Host Microbe* **15**, 611–622 (2014).
22. Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T., Berman, P. & Abrignani, S. T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature* **334**, 530–532 (1988).
23. Barnaba, V., Watts, C., de Boer, M., Lane, P. & Lanzavecchia, A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur. J. Immunol.* **24**, 71–75 (1994).
24. Klebanoff, C. A. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9571–9576 (2005).
25. Brockstedt, D. G. *et al.* *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13832–13837 (2004).
26. Clarke, S. R. *et al.* Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 110–117 (2000).
27. Hogquist, K. A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).
28. Lyons, A. B., Blake, S. J. & Doherty, K. V. Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 9**, Unit9.11 (2013).
29. Wetzel, S. A. & Parker, D. C. MHC transfer from APC to T cells following antigen recognition. *Crit. Rev. Immunol.* **26**, 1–21 (2006).
30. Dudziak, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**, 107–111 (2007).
31. Raghavan, M., Del Cid, N., Rizvi, S. M. & Peters, L. R. MHC class I assembly: out and about. *Trends in Immunology* **29**, 436–443 (2008).
32. Lang, T. J., Nguyen, P., Peach, R., Gause, W. C. & Via, C. S. In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function. *J. Immunol.* **168**, 3786–3792 (2002).
33. Dustin, M. L. & Groves, J. T. Receptor Signaling Clusters in the Immune Synapse. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 543–556 (2012).
34. Gomez, T. S. *et al.* Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat Immunol* **6**, 261–270 (2005).
35. Calabia-Linares, C. *et al.* Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *J. Cell Sci.* **124**, 820–830 (2011).
36. Lang, D. *et al.* Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* **433**, 884–887 (2005).
37. Raulet, D. H. MHC class I-deficient mice. *Adv. Immunol.* **55**, 381–421 (1994).
38. Huster, K. M. *et al.* Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 5610–5615 (2004).
39. Boettler, T. *et al.* Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8+ T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Virology* **80**,

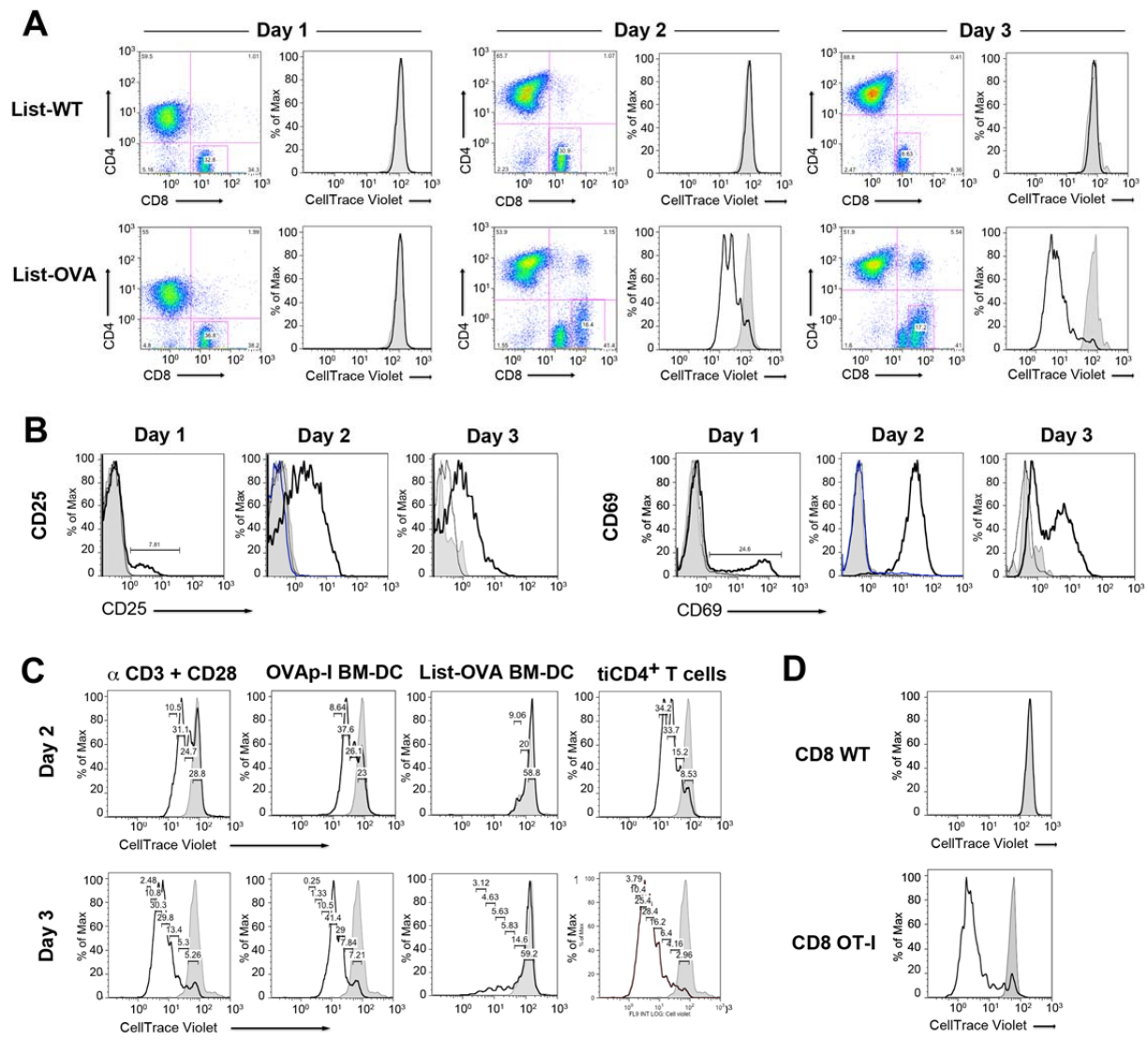
- 3532–3540 (2006).
40. Goldszmid, R. S. *et al.* TAP-1 indirectly regulates CD4⁺ T cell priming in *Toxoplasma gondii* infection by controlling NK cell IFN-gamma production. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 2591–2602 (2007).
 41. Thäle, C. & Kiderlen, A. F. Sources of interferon-gamma (IFN-gamma) in early immune response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* **210**, 673–683 (2005).
 42. De Pascalis, R., Taylor, B. C. & Elkins, K. L. Diverse myeloid and lymphoid cell subpopulations produce gamma interferon during early innate immune responses to *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* **76**, 4311–4321 (2008).
 43. Bjorkdahl, O. *et al.* Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues. *Immunology* **110**, 170–179 (2003).
 44. Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* **12**, 269–281 (2012).
 45. Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 20**, Unit 20.1 (2001).
 46. Bellone, M. *et al.* Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J. Immunol.* **165**, 2651–2656 (2000).
 47. Borroto, A. *et al.* Relevance of Nck-CD3 epsilon interaction for T cell activation in vivo. *J. Immunol.* **192**, 2042–2053 (2014).
 48. Jung, S. *et al.* In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211–220 (2002).
 49. Cruz-Adalia, A. & Veiga, E. Close Encounters of Lymphoid Cells and Bacteria. *Front Immunol* **7**, 866–15 (2016).
 50. Hor, J. L. *et al.* Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity* **43**, 554–565 (2015).
 51. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2012).
 52. Amezquita, R. A. & Kaech, S. M. Immunology: The chronicles of T-cell exhaustion. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature21508
 53. Wang, R.-F. & Wang, H. Y. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Research* **27**, 11–37 (2017).
 54. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74 (2015).
 55. Gubin, M. M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577–581 (2014).
 56. Mayordomo, J. I. *et al.* Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* **1**, 1297–1302 (1995).
 57. Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40 (1998).
 58. Kaye, J. *et al.* Selective development of CD4⁺ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* **341**, 746–749 (1989).
 59. Martínez-Martín, N. *et al.* T Cell Receptor Internalization from the Immunological Synapse Is Mediated by TC21 and RhoG GTPase-Dependent Phagocytosis. *Immunity* **35**,

- 208–222 (2011).
60. Medina, F. *et al.* Furin-processed antigens targeted to the secretory route elicit functional TAP1-/-CD8+ T lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* **183**, 4639–4647 (2009).
61. Mombaerts, P. *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869–877 (1992).
62. Cruz-Adalia, A., Ramirez-Santiago, G., Torres-Torresano, M., Garcia-Ferreras, R. & veiga chacón, E. T Cells Capture Bacteria by Transinfection from Dendritic Cells. *JoVE* e52976 (2016). doi:10.3791/52976

Acknowledgements:

We are grateful to Laura Díaz-Muñoz for technical help with flow cytometry, Carlos Oscar Sánchez-Sorzano for help with the statistics, Ignacio Melero for providing the B16-OVA melanoma cell line, Peter Klatt for critical reading of the manuscript and Catherine Mark for editorial assistance. This work was supported by the grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (MICINN; BFU2011-29450 to EV) and Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2014-56716-REDT to EV, BFU2014-59585-R to EV, SAF2011-25834 to FSM, SAF2013-47975-R to BA, SAF2014-58895-JIN to AC-A, ISCIII (PI14/00526; CP11/00145; CPII16/00022) to JMG-G, Fundación Ramón Areces financed JMG-G), the Madrid regional government (INDISNET-S2011/BMD-2332 to FSM) and the European Research Council (ERC-2011-AdG 294340-GENTRIS to FSM, ERC 2013-AdG 334763 NOVARIPP to BA). JMG-G salary is supported by Miguel Servet Program (ISCIII) and VZ by ISCIII.

Figure 1



680

681 **Figure 1. tiCD4⁺ T cells cross-prime naïve CD8⁺ T cells.** A, OT-I naïve CD8⁺ T cell

682 proliferation 1, 2 or 3 days after contact *Listeria*-WT (top panels) or *Listeria*-OVA (bottom)

683 tiCD4⁺ T cells, was measured by CellTrace Violet staining. Non-activated naïve CD8⁺ T cells

684 are shown in grey. B, CD25 or CD69 expression by CD8⁺ T cells incubated with *Listeria*-WT

685 (thin black line) or *Listeria*-OVA (thick black line) tiCD4^+ T cells. Non-proliferative CD8^{low}
686 population (blue) or non-activated CD8^+ T cells (grey) are shown. **C**, Proliferation of CD8^+ T
687 cells activated by anti-CD3/CD28 antibodies, by OVAp-I-loaded BM-DC, by *Listeria*-OVA
688 BM-DC or by *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells, on day 2 (top) or day 3 (bottom) post-activation.
689 Non-activated CD8^+ T cells are shown (grey). **D**, Proliferation of CD8^+ T cells from C57BL/6-
690 WT or OT-I mice after conjugation with *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells.

691

Figure 2

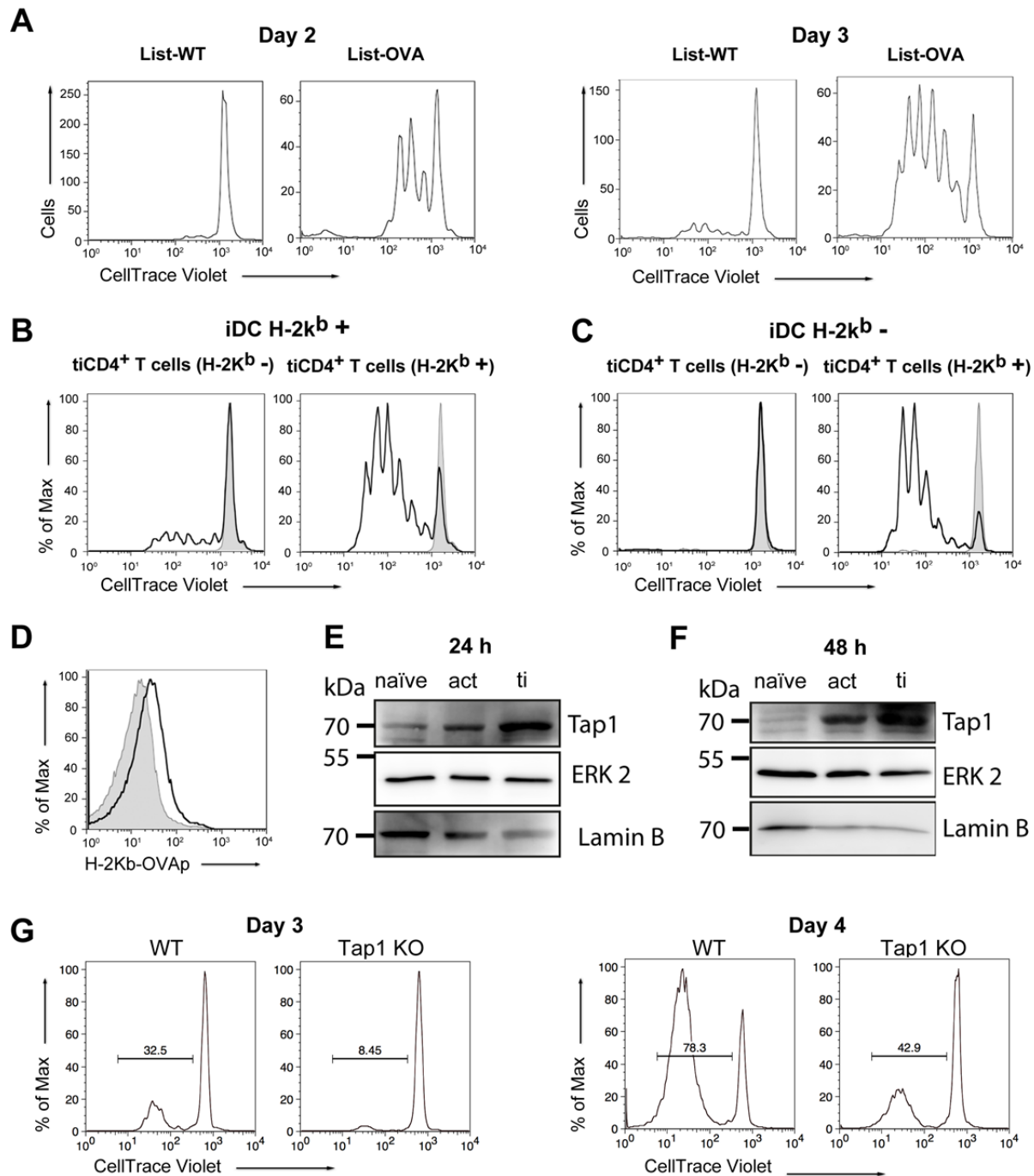


Figure 2. tiCD4⁺ T cells process bacterial antigens. A, Proliferation of OT-I CD8⁺ T cells 2 or 3 days after incubation with *Listeria*-WT- or *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells, which captured bacteria from OVAp-I-loaded BM-DC. **B,** Proliferation of OT-I CD8⁺ T cells incubated with

697 *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (H-2K^b or H-2K^{b+}) which captured bacteria from infected H-2K^{b+}
 698 BM-DC (iDC), or incubated with *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells (grey). **C**, as **B**, except
 699 transphagocytosis, with infected BM-DC (iDC) that were H-2K^b (H-2K^{k/k}), that lasted 48h. **D**,
 700 H-2K^b/OVA expression (detected with anti-OVAp-I/H-2K^b antibody) by *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T
 701 cells (H-2K^{b+}, black line; H-2K^b, grey) that captured bacteria from H-2K^b BM-DC. **E,F**,
 702 Western blot showing Tap1 expression in naïve, activated (*act*, by OVAp-I-loaded BM-DC)
 703 CD4⁺ T cells, or *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (ti) at 24 (e) or 48 h (f) after activation. ERK2
 704 and laminB were used as controls. **G**, Proliferation of CD8⁺ T cells from OT-I mice 3 or 4 days
 705 after conjugation with *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (from Tap1 KO, or their isogenic WT mice).
 706

Figure 3

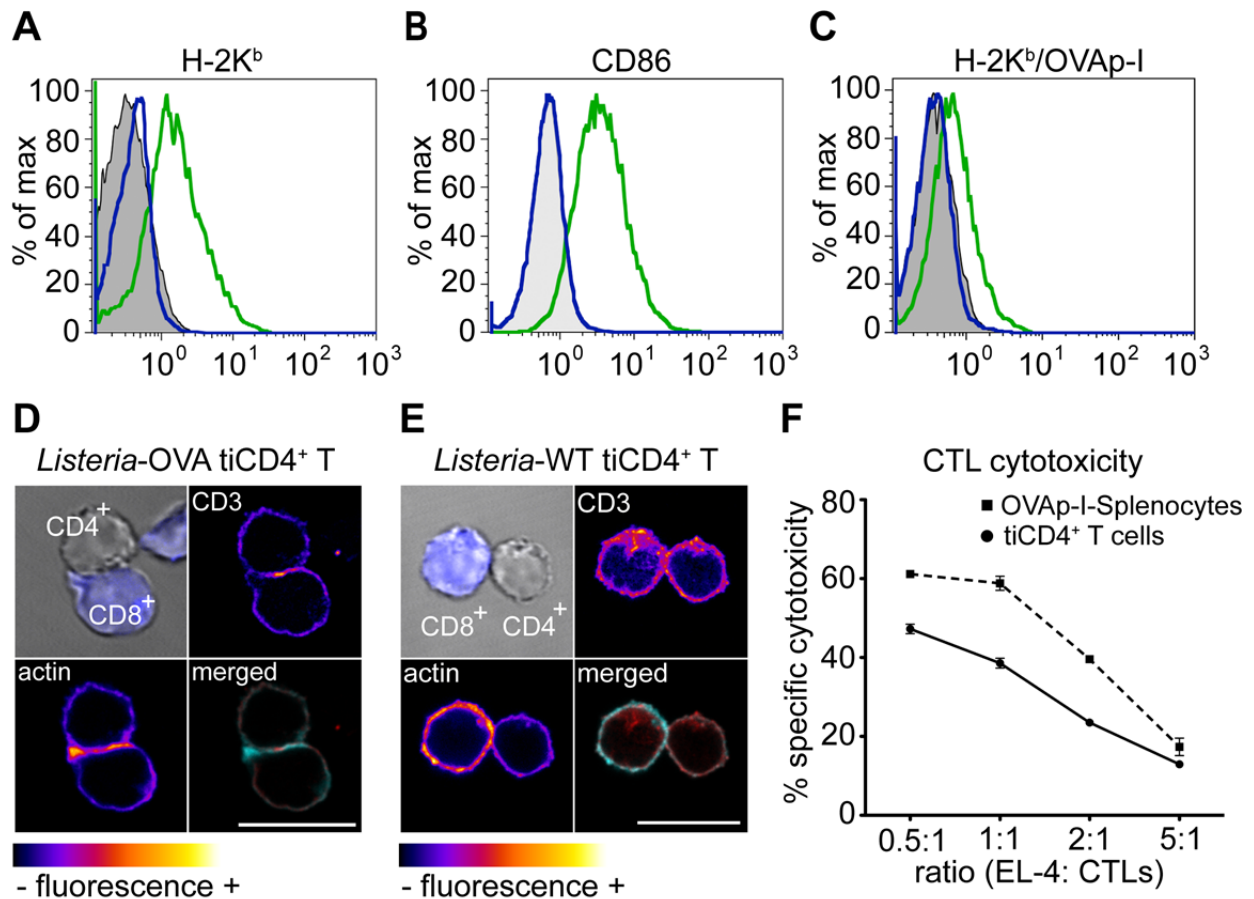


Figure 3. tiCD4⁺ T cells establish immune synapses with naïve CD8⁺ T cells. H-2K^b (A) or CD86 (B) expression on CD4⁺ T cells before (blue line) and after *Listeria*-OVA transphagocytosis (green line). Antibody negative controls are shown (grey). C, H-2K^b/OVA expression on *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells, 24 (blue line) or 48 h (green line) post-transphagocytosis and on non-transphagocytic T cells (grey). Confocal images of *Listeria*-OVA (D) or *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells (E) incubated 1 h with OT-I naïve CD8⁺ T cells (blue). CD3 and actin fluorescence is shown on a “fire” scale. Merged images show, actin (cyan) and CD3 (red). Bars= 10 μm. F, Relative specific cytotoxicity of effector CD8⁺ T cells (CTL) activated by

717 *Listeria*-OVA tiCD4^+ T cells (solid line) or by OVAp-I-loaded splenocytes (dashed line).

718 Different EL-4 (target cell):CTL ratios were measured.

719

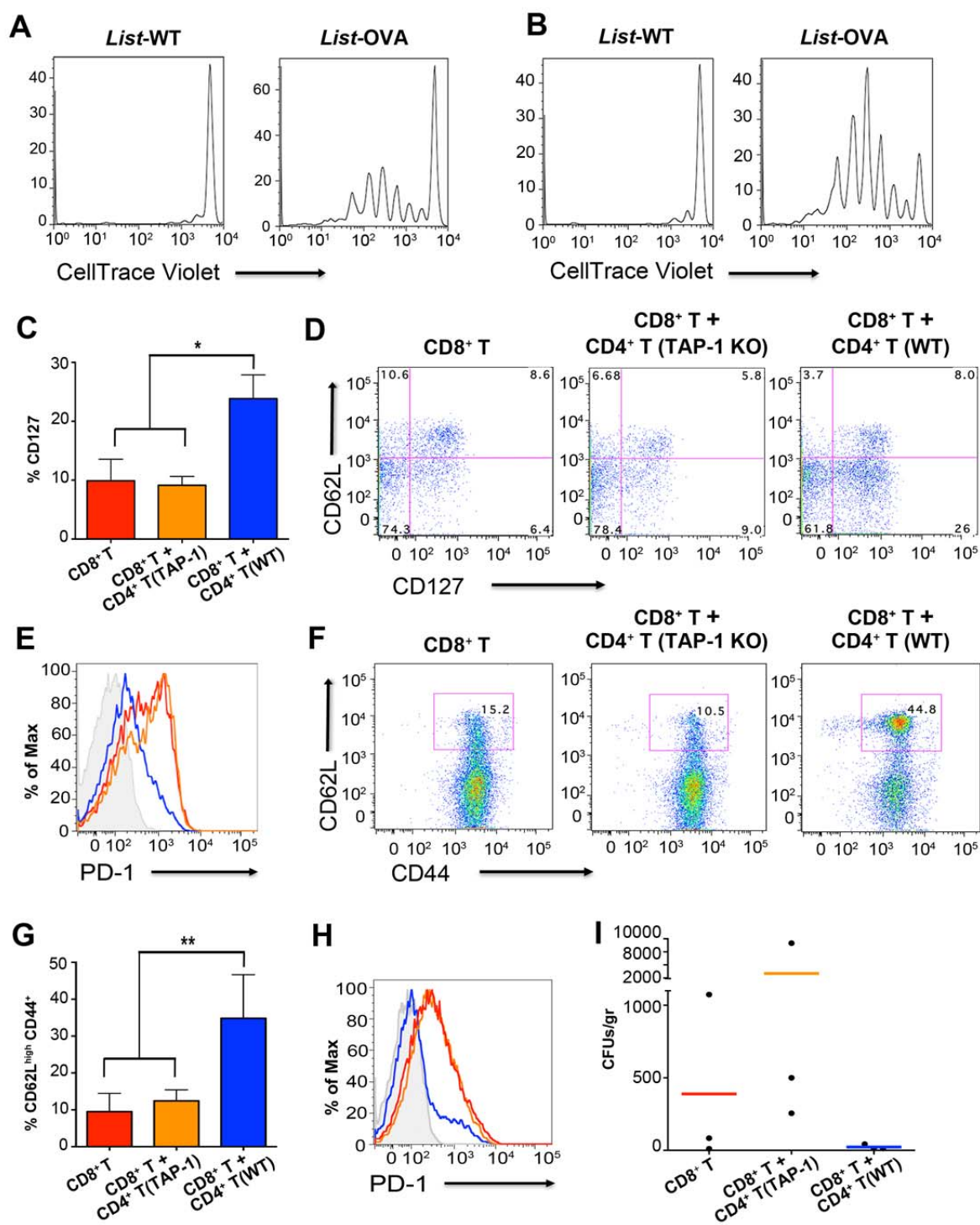
720

721

722

723

Figure 4



725

726 **Figure. 4. tiCD4⁺ T cells cross-present bacterial antigens *in vivo* and generate central**
727 **memory CD8⁺ T cells. A-B,** *In vivo* proliferation of CellTrace Violet-stained OT-I
728 CD8⁺CD45.1⁺ T cells, injected into recipient C57BL/6 CD45.2⁺ mice. *Listeria*-WT or *Listeria*-
729 OVA tiCD4⁺ T cells (2 x 10⁶, A; 5 x 10⁶, B) were adoptively transferred into recipient mice and
730 proliferation of CD8⁺CD45.1⁺ cells was analysed 3 days after adoptive transfer. **C-H,** Phenotypic
731 analysis of memory CD8⁺ T cells generation *in vivo*. Rag1 KO mice were adoptively transferred
732 (*iv*) with: only WT CD8⁺ T cells (group 1), Tap1 KO CD4⁺ T and WT CD8⁺ T cells (group 2),
733 and WT CD4⁺ T and WT CD8⁺ T cells (group 3). The day after, all mice were challenged with *L.*
734 *monocytogenes* (1000 bacteria/mice; *iv*). 12 days **C-E**, and 30 days **F-H**, after challenge, the
735 CD8⁺ T cell population from spleen was analysed. **C**, % of CD127⁺, gated on
736 CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L⁻, pre-memory T cells analysed by flow cytometry. It is shown the
737 median of three mice per group (group 1 is shown in red, group 2 in orange and 3 in blue), the
738 error bar represents the SD. * indicates p<0.05 analysed by ANOVA and Bonferroni post-test.
739 The same results were observed when analysed the whole population of CD3⁺CD8⁺CD44⁺ T
740 cells (data not shown) **D**, Representative dot plots showing CD62L and CD127 staining from the
741 CD3⁺CD8⁺CD44⁺ T cell population. **E**, Representative histogram showing PD-1 levels on
742 CD3⁺CD8⁺CD44⁺ T cell population. Red line represents the group 1, orange line the group 2 and
743 blue line the group 3. The Fluorescence Minus One (FMO) control is represented in grey line. **F**,
744 Representative dot plots showing CD62L and CD44 staining gated on CD3⁺CD8⁺ T cell
745 population. The CD62L^{high} population was also positive for CD127 (not shown). **G**, % of
746 CD62L^{high} CD44⁺ gated on F. It is shown the median of four mice per group (group 1 is shown
747 in red, group 2 in orange and 3 in blue), the error bar represents the SD. * indicates p<0.05

analysed by ANOVA and Bonferroni post-test. **H**, Representative histogram showing the amount of PD-1 on CD3⁺CD8⁺CD44⁺ T cell population. Red line represents the group 1, orange line the group 2 and blue line the group 3. FMO control is represented in grey line **I**, Bacterial (*L. monocytogenes*) load in the spleen 2 days after a second bacterial challenge, 50 days following the first one. Each dot represents data from one mice (three per group), the media is shown in red for group 1, orange group 2 and blue group 3.

Figure 5

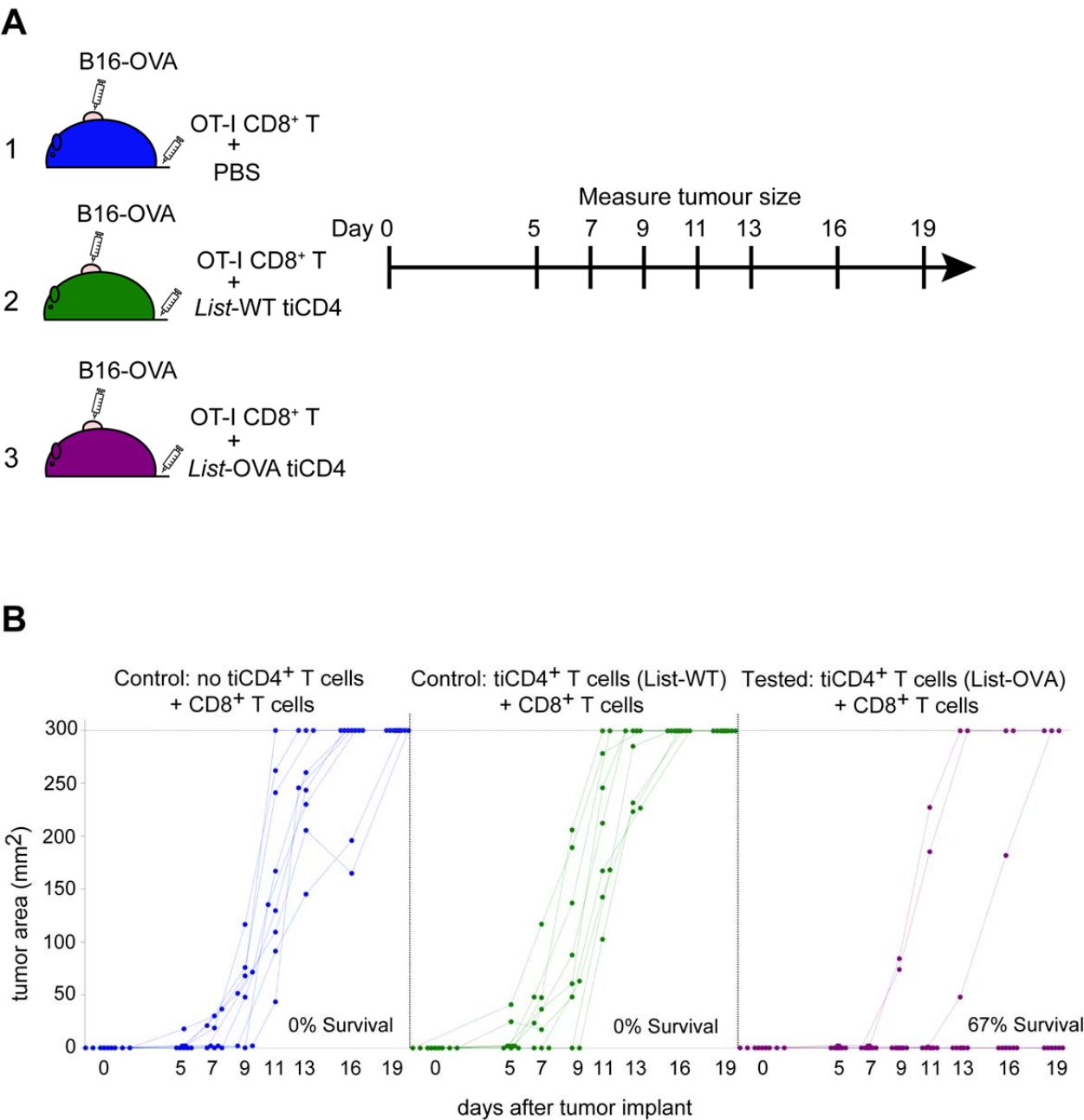
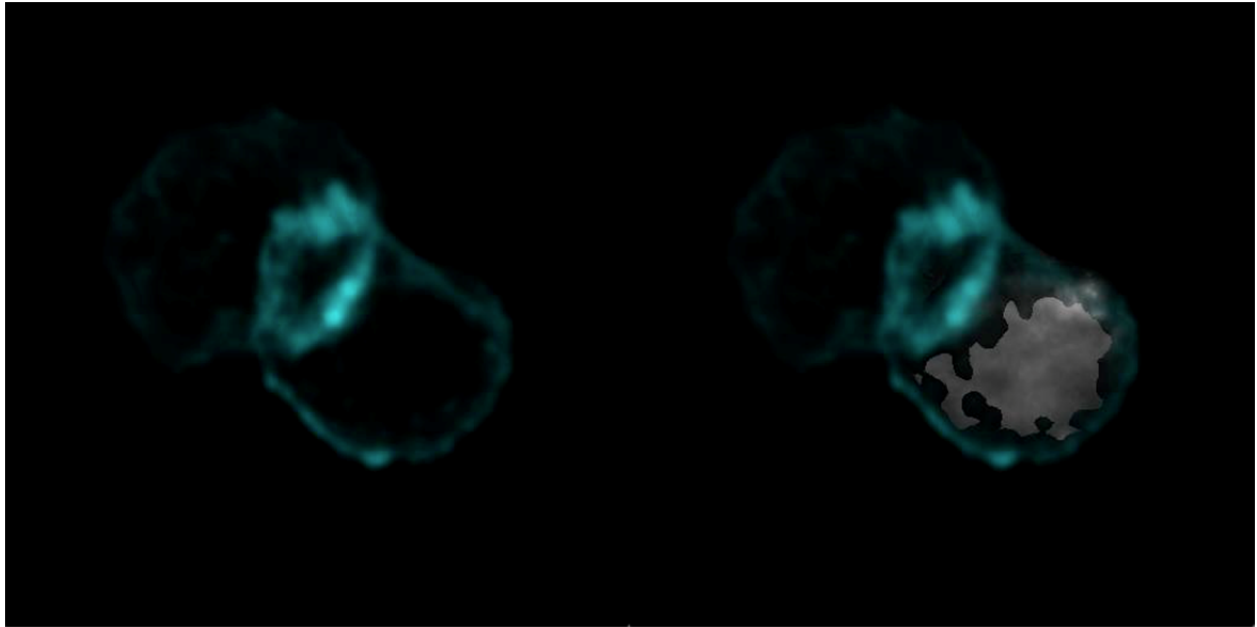


Figure 5. tiCD4⁺ T cells protect from melanoma. A, scheme, and **B** results of the proof of concept experiment testing the ability of tiCD4⁺ T cells to activate CD8⁺ T cells that recognize

and eliminate the tumour. OVA-expressing B16 melanoma cells (5×10^5) were injected s.c. in the mid-right flank of recipient mice. All groups (9 mice/group) were adoptively transferred with naïve CD8⁺ T cells from OT-I mice, together with PBS (group1, blue), *Listeria*-WT tiCD4⁺ T cells (group 2, green) or *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells (group 3, magenta). Tumours were monitored every 2-3 days. In B, each dot represents the tumour size in one mouse measured at the indicated time. Mice with tumour reaching 300 mm² were sacrificed to avoid unnecessary suffering. The % of survival is indicated.

770 **Supplementary Materials.**

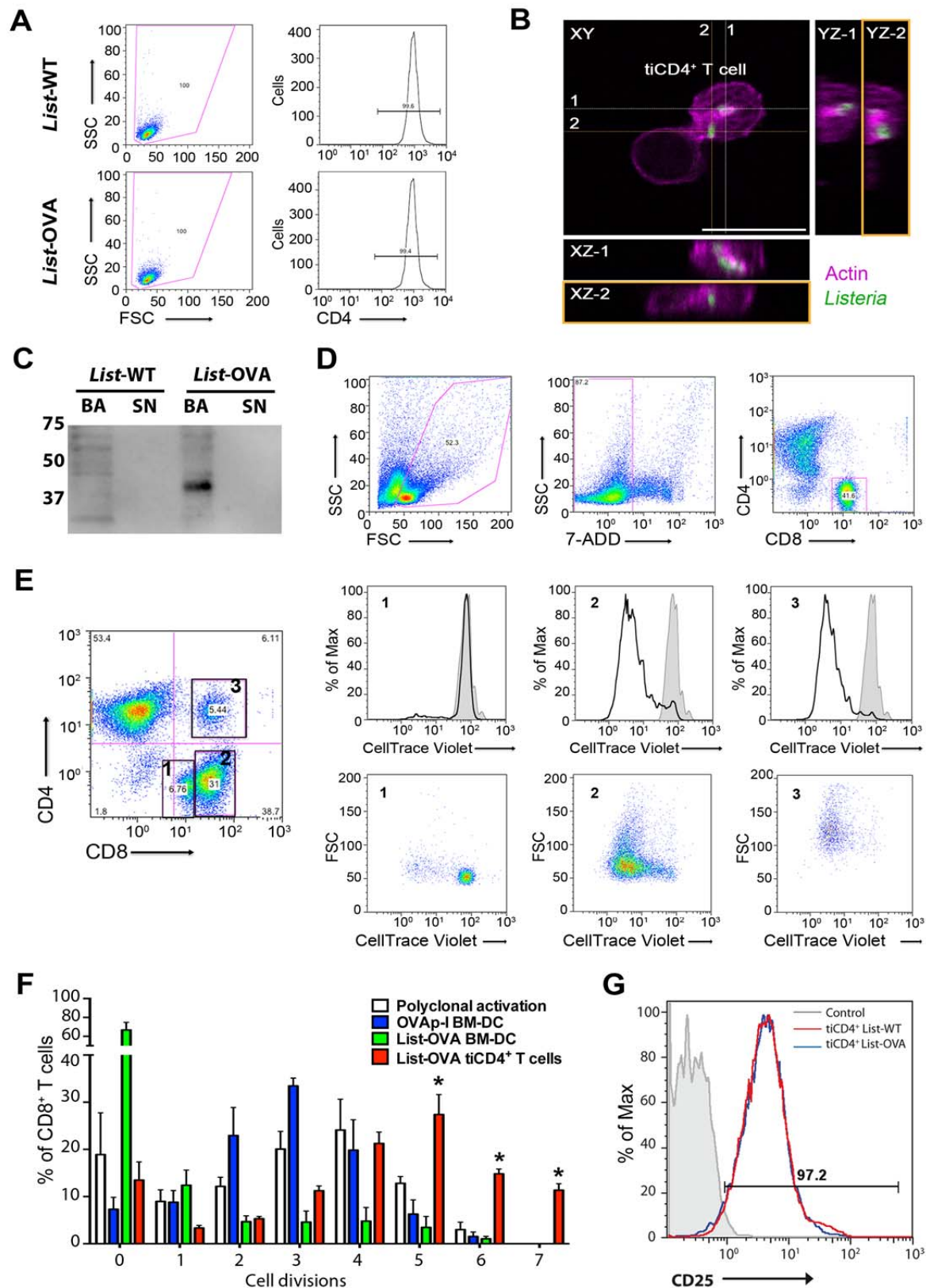


771
772 **Supplementary Movie 1.** Three-dimensional rendering of confocal images showing an IS
773 formed by *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells and naïve CD8⁺ T cell from OT-I mouse. Naïve CD8⁺
774 T is shown in grey and actin in cyan.

775

776

Supp. Figure 1



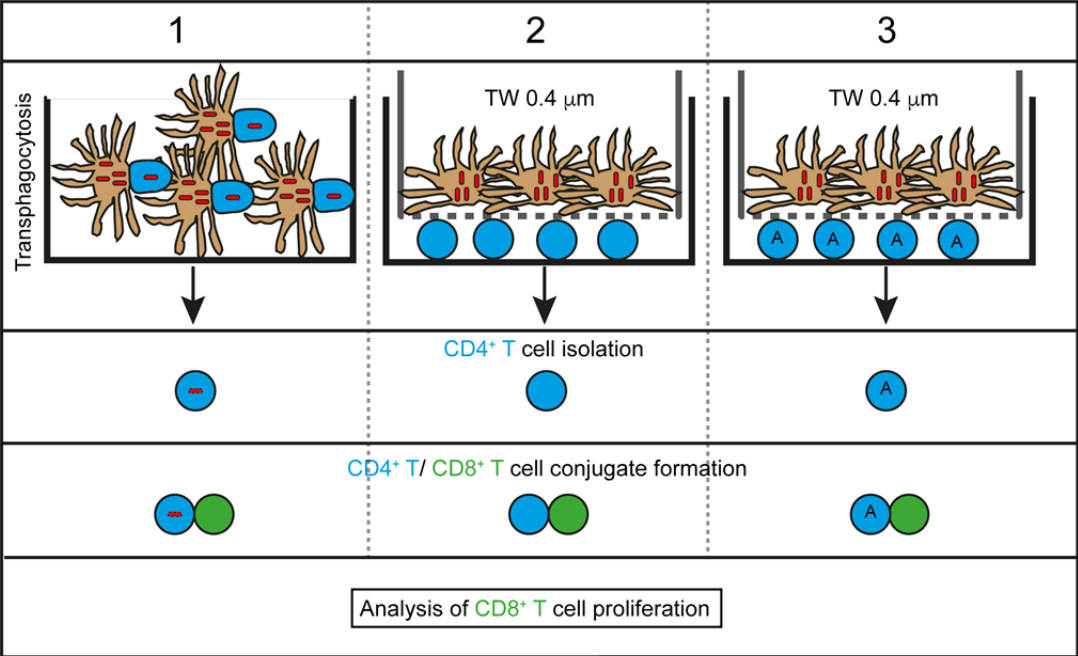
778

779 **Supplementary Figure 1. A,** Purity of *Listeria*-WT or *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells after cell
780 sorting. Size and complexity are shown by plotting Side-scattered (SSC) vs Forward-scattered
781 (FSC) light (left panels) **B,** Orthogonal views of *Listeria* tiCD4⁺ T cells purified after 3h of
782 conjugate formation. Actin is shown in magenta, and *Listeria* in green. XY together with YZ and
783 XZ views (from the lines marked in XY) are shown. Bar represents 10 μ m. **C,** OVA, bacterial
784 associated (BA) or in the concentrated supernatant (SN), detected by Western-blotting. Bacteria
785 tested were *Listeria*-WT (*List*-WT) or *Listeria*-OVA (*List*-OVA). **D,** Gating strategy for flow
786 cytometry analysis to measure CD8⁺ T cell proliferation induced by tiCD4⁺ T cells. Only viable
787 cells (7-AAD negative) were analysed. CellTrace Violet staining was analysed in CD8⁺
788 population. **E,** *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T were incubated with naïve OT-I CD8⁺ T cells for 72h.
789 CellTrace Violet staining was analysed in three populations positive for CD8, CD8^{low} (1),
790 CD8^{high} (2) and CD4⁺CD8⁺ cell conjugates (3). The same populations were analysed to detect
791 blasts (activated T cells), which are larger than non-activated T cells (positive in FSC, forward
792 scatter). **F,** Quantification of CD8⁺ T cells proliferation after 3 days activation with anti-
793 CD3/CD28 antibodies (polyclonal activation), OVAp-I-loaded BM-DC, BM-DC infected with
794 *Listeria*-OVA or *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells. The percentage of CD8⁺ T cells that divided at
795 indicated times is shown. * indicated significant differences ($P \leq 0.05$) analysed two-way
796 analysis of variance (ANOVA) followed Bonferroni post-test. Column bars represent the mean \pm
797 SD of four independent experiments. **G,** *Listeria*-WT- (red line) or *Listeria*-OVA- (blue line)
798 tiCD4⁺ T cell activation measured by CD25 expression. CD25 levels of non-activated
799 lymphocytes is shown in grey.

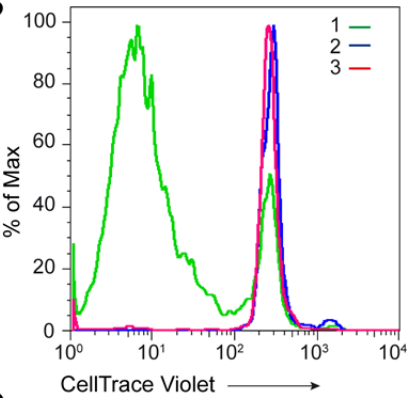
800

Supp. Figure 2

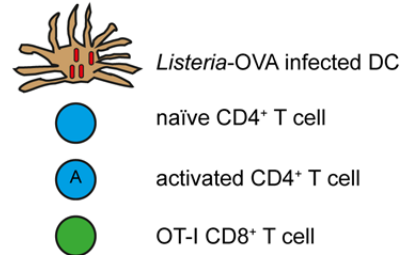
A



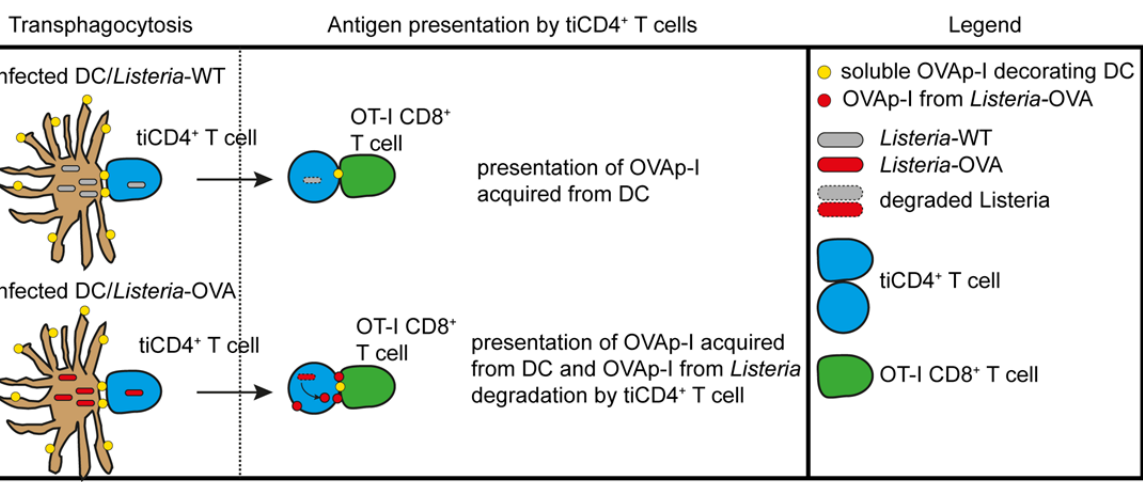
B



Legend

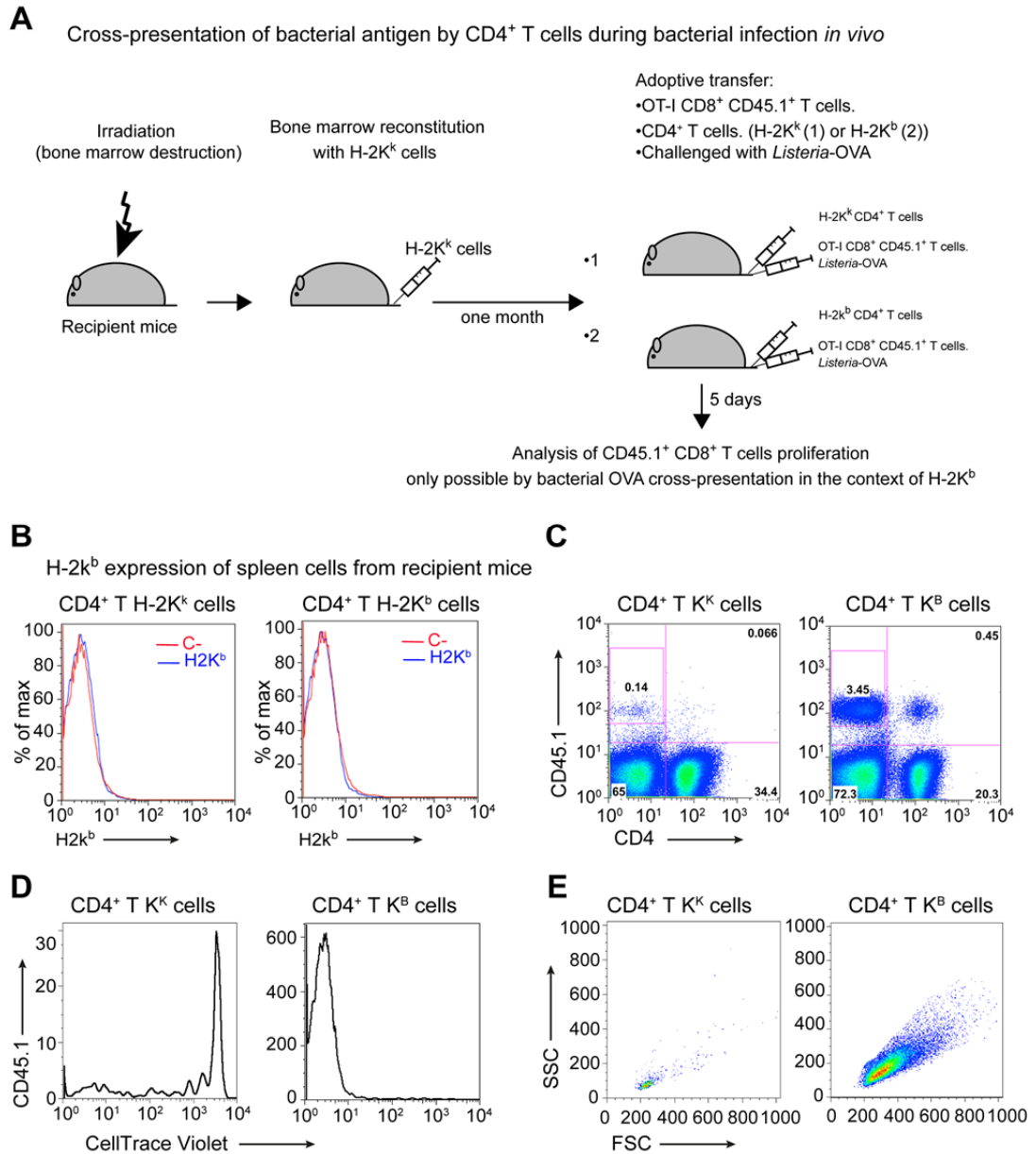


C



Supplementary Figure 2. A, Scheme of the experiment performed in Supplementary Figure 2B. *Listeria*-OVA infected DCs were allowed to contact OT-II CD4⁺ T cells (condition 1). Alternatively, *Listeria*-OVA infected DC were grown on a polycarbonate barrier of 0.4 µm that allowed the passage of soluble material including proteins or exosomes but impede the cellular contact with non-activated (condition 2) or activated (in the presence of anti CD3 and CD28; condition 3) OT-II CD4⁺ T cells. 16h later, CD4⁺ T cells were re-isolated by cell sorting and used as APCs to activate OT-I CD8⁺ T cells. **B,** OT-I CD8⁺ T cells proliferation 4 days after contact with CD4⁺ T cells described in A as APCs. Green line corresponds to condition 1, blue line to condition 2 and magenta line to condition 3. **C,** Scheme of the experiment performed in Figure 2A. BM-DC were infected with *Listeria*-WT or *Listeria*-OVA and loaded with OVAp-II (to allow bacterial transphagocytosis to OT-II CD4⁺ T cells) and OVAp-I (the peptide stimulating CD8⁺ T cells from OT-I mice). OT-II CD4⁺ T cells were incubated with these BM-DC to allow bacterial transphagocytosis; after 24 h, they were re-isolated by cell sorting and conjugated with naïve OT-I CD8⁺ T cells. During conjugation, tiCD4⁺ T cells could acquire MHC-I/OVAp-I from DC membrane. If this is the main source of MHC-I/antigen activating CD8⁺ T cells, we would detect similar CD8⁺ T cell activation in both groups; if tiCD4⁺ T cells process and present bacterial antigens via their own MHC-I molecules, *Listeria*-OVA tiCD4⁺ T cells would induce more potent CD8⁺ T cells activation.

Supp. Figure 3



Supplementary Figure 3. A. Scheme of an experimental approach followed to determine whether CD4⁺ T cells cross-present bacterial antigens during the course of an *in vivo* bacterial infection, activating naïve OT-I CD8⁺ T cells. Bone marrow of C57BL/6 mice were lethally irradiated and transplanted with bone marrow cells from H-2K^k mice. One month later, CD4⁺ T cells expressing the H-2K^k haplotype (condition 1) or CD4⁺ T cells expressing H-2K^b, (condition

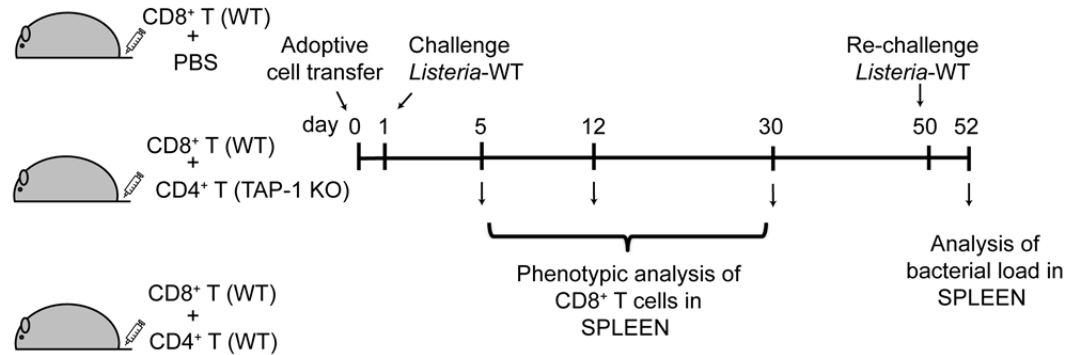
2), were adoptively transferred, together with CD8⁺CD45.1⁺ T cells from OT-I mice and MCC peptide. In addition, recipient mice were infected with *Listeria*-OVA (10⁴ bacteria/mouse). 5 days after infection, spleens were isolated from recipient mice and the proliferation of CD8⁺ T cells from OT-I mice (previously stained with CellTrace Violet) was detected by flow cytometry.

B. As control of bone marrow elimination in recipient mice, the presence of H-2K^b haplotype was tested in samples from the spleen (CD45.1⁻ CD4⁻). Red lines indicate the signal of the background signal from secondary antibodies, blue lines indicate the expression of H-2K^b. **C,** Dot plots showing the population of OT-I CD8⁺ T cell (CD45.1⁺ CD4⁻) analysed 5 days after infection with *Listeria*-OVA. **D,** Proliferation of the transferred OT-I CD8⁺ T cells 5 days after infection. **E,** the size and complexity of the transferred OT-I CD8⁺ T cells were analysed in SSC-A and FSC-A to detect blasts (activated T cells). OT-I CD8⁺CD45.1⁺ cells were clearly activated in the mouse injected with H-2K^b CD4⁺ T cells and not in the condition 1.

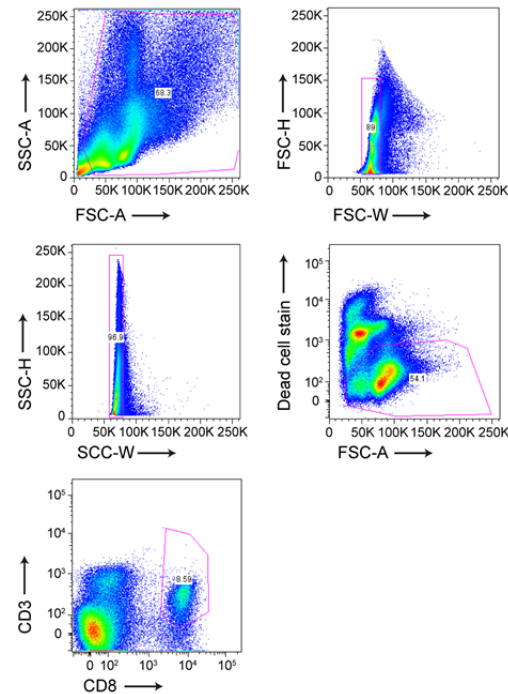
Supp. Figure 4

A

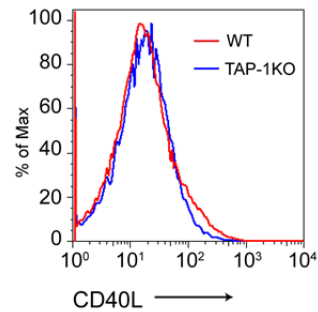
RAG-1^{-/-} mice



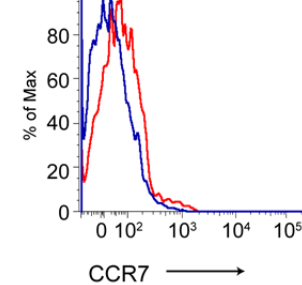
B



C



D



841

842 **Supplementary Figure 4. A**, Scheme of the experiment described in Fig. 4. **B**, Gating strategy
 843 for flow cytometry analysis of memory CD8⁺ T cells. All cells, excluding debris was taken by
 844 size and complexity (upper left panel). From this selection, we gated for singlets (FSC-H vs
 845 FSC-W and SSC-H vs SSC-W). Then, we excluded dead cells and finally lymphocytes were

846 analysed by antibody staining; CD3⁺CD8⁺ (lower panel). **C**, Expression of CD40L on polyclonal
847 activated CD4⁺ T cells from WT (red line) and Tap-1 KO (blue) mice. **D**, Levels of CCR-7 on
848 CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD62L^{high} population from a mouse injected with CD4⁺ WT cells (red line) or
849 injected with CD4⁺ TAP-1 KO cells (blue line) after 30 days of *Listeria* challenge.

850